

**ZUM MECHANISMUS DER PHOTOSYNTHETISCHEN
WASSERSTOFFENTWICKLUNG IN DER
GRÜNALGE CHLAMYDOMONAS REINHARDI**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

DORIS GODDE

aus Castrop-Rauxel

Bochum, 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUM MECHANISMUS DER PHOTOSYNTHETISCHEN
WASSERSTOFFENTWICKLUNG IN DER
GRÜNALGE CHLAMYDOMONAS REINHARDI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

DORIS GODDE

aus Castrop-Rauxel

Bochum, 1979



Referent: Prof. Dr. A. Trebst
Koreferent: Prof. Dr. J. Feierabend

1. Einleitung

2. Zielsetzung

3. Methodik

1.1. Beschreibung der Aufgabenstellung (Problemstellung)

1.2. Zielsetzung und Umfang der Untersuchung (Ziele, Fragestellungen, Hypothesen)

1.3. Beschreibung der Untersuchungsmethoden (Methodenwahl, Datenerhebung, Datenauswertung)

Meinen lieben Eltern

1.4. Beschreibung der Untersuchungsergebnisse (Ergebnisse, Diskussion, Zusammenfassung)

1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse (Ergebnisse, Diskussion, Zusammenfassung)

1.6. Zusammenfassung der Ergebnisse (Ergebnisse, Diskussion, Zusammenfassung)

1.7. Zusammenfassung der Ergebnisse (Ergebnisse, Diskussion, Zusammenfassung)

4. Ergebnisse

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Ergebnisse</u>	6
1. Photoproduktion von H_2 mit intakten Chlamydomonas reinhardi	6
2. Isolation und Eigenschaften von photosynthetisch aktiven Partikeln aus Chlamydomonas reinhardi CW - 15	8
3. Anaerobe Photoreduktion von MV durch Chlamydomonaspartikel	20
4. Photosynthetische H_2 - Entwicklung mit Chlamydomonaspartikeln, gekoppelter Clostridienhydrogenase und artifiziellem Donorsystem	26
5. Photoproduktion von H_2 auf Kosten eines endogenen Donors im zellfreien System mit Chlamydomonaspartikeln und angekoppelter Clostridienhydrogenase	30
6. NADH als Elektronendonator für Photosystem I in Chlamydomonaspartikeln	38
7. Isolation einer Komponente aus Chlamydomonaspartikeln, die die NADH - Photooxidation in Ultraschallpartikeln rekonstituiert	45
<u>Diskussion</u>	65
<u>Zusammenfassung</u>	80
<u>Material und Methoden</u>	83
<u>Literaturverzeichnis</u>	96

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
Asc	Natriumascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
Chl	Chlorophyll
Cyt	Cytochrom
DAD	2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenylendiamin
DBMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCMU	3(3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol
DNP - INT	2,4-Dinitrophenylether von Jodnitrothymol
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EDAC	1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl)-carbodiimid
F-1,6-P	Fructose-1,6-bisphosphat
fd	Ferredoxin
FeCy	$K_3Fe(III)(CN)_6$
G-6-P	Glucose-6-phosphat
Gram.	Gramicidin
MV	Methylviologen
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(phosphat)
PCy	Plastocyanin
PEP	Phosphoenolpyruvat
3-PGS	3-Phosphoglycerinsäure
PMS	N-Methyl-phenazonium-methosulfat
P _i	Phosphat

PQ	Plastochinon
PS II	Photosystem II
PS I	Photosystem I
Pyr	Pyruvat
TMPD	N'N'N'N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin
UpM	Umdrehungen pro Minute
PD	Phenylendiamin

Einleitung

Die photosynthetischen Mechanismen einzelliger, eukaryotischer Algen stimmen im wesentlichen mit denen höherer Pflanzen überein. Bei beiden findet die Assimilation von CO_2 in speziellen Organellen, den Chloroplasten statt. Mit der CO_2 - Fixierung geht eine O_2 - Entwicklung einher, die auf die photosynthetische Wasserspaltung zurückzuführen ist. Die photosynthetische Wasserspaltung ist kennzeichnend für höhere Pflanzen, Algen und Cyanobakterien. Sie ist möglich, weil diese Organismen zwei Photosysteme besitzen, von denen Photosystem II die Wasserspaltung katalysiert. Photosystem I dagegen ist für die Reduktion von NADP verantwortlich, das als Reduktionsmittel für die CO_2 - Fixierung dient. Die Elektronen aus der Wasserspaltung gelangen von Photosystem II über eine Reihe von Redox-carriern, zu denen Plastochinon, Cytochrome und Plastocyanin zählen, zu Photosystem I. Mit diesem Elektronentransport ist die Bildung von ATP gekoppelt, das die für die CO_2 - Fixierung notwendige Energie liefert. Alle Komponenten der Elektronentransportkette, sowohl die beiden Photosysteme als auch die Redox-komponenten sind in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert.

Anders als höhere Pflanzen, Algen und Cyanobak-

terien besitzen photosynthetische Bakterien nur ein Photosystem. Sie können daher H_2O nicht als Elektronendonator für die CO_2 - Fixierung benutzen. Als Elektronendonatoren stehen ihnen Sulfide und Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels, wie Succinat, zur Verfügung (siehe Knaff, 1978). Auch H_2 kann die Photoreduktion von CO_2 in photosynthetischen Bakterien unterhalten (siehe Yoch, 1978).

H_2 kann aber auch in eukaryotischen, einzelligen Algen nach einer gewissen Adaptionszeit unter anaeroben Bedingungen Elektronendonator für die CO_2 - Fixierung sein (Gaffron, 1940). Mit dieser Fähigkeit zeigen die eukaryotischen Algen Ähnlichkeiten mit photosynthetischen Bakterien, nicht aber mit höheren Pflanzen, die keinen H_2 - Stoffwechsel aufweisen. Analog zu der Bakterienphotosynthese ist auch die Photoreduktion von CO_2 mit H_2 in Algen nur von einem Photosystem abhängig, nämlich von Photosystem I (Bishop u. Gaffron, 1962).

Neben der Photoreduktion, also der H_2 - Aufnahme, weisen Algen unter anaeroben Bedingungen auch eine lichtabhängige H_2 - Entwicklung auf (Photoproduktion) (Gaffron u. Rubin, 1942). Diese ist außer bei Cyanobakterien nur von photosynthetischen Bakterien bekannt. Während in Cyanobakterien und in photosynthetischen Bakterien die Nitrogenase die lichtabhängige

H_2 - Entwicklung katalysiert, ist in Algen die H_2 - Entwicklung auf die Aktivität einer Hydrogenase zurückzuführen (Neuere Übersichtsartikel zum lichtabhängigen H_2 - Stoffwechsel siehe Kessler, 1974; 1976; 1978; Hallenbeck u. Benemann, 1979; Krasnovsky, 1979; Bishop u. Jones, 1978).

Die zur Photoproduktion von H_2 notwendigen Reduktionsäquivalente können aus der Wasserspaltung stammen. In diesem Fall ist die lichtabhängige H_2 - Entwicklung von beiden Photosystemen abhängig. Die Beteiligung von Photosystem II geht aus der gleichzeitigen Entwicklung von O_2 und H_2 hervor (Spruit, 1954; 1958; Bishop u. Jones, 1978; Bishop et al., 1977). Auch Arbeiten mit Photosystem II - defekten Mutanten unterstreichen die Bedeutung von Photosystem II an der Photoevolution von H_2 (Bishop et al., 1977) Doch wird durch den freigesetzten Sauerstoff die Hydrogenase inhibiert. Daher kommt die H_2 - Entwicklung schon nach kurzer Zeit zum Erliegen.

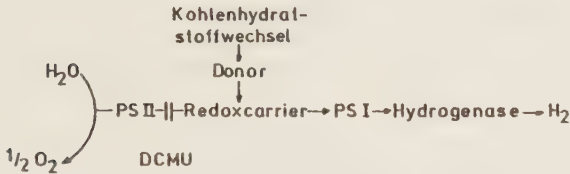
Die Reduktionsäquivalente für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung können aber auch dem Kohlenhydratstoffwechsel entstammen. Zwar können Gärungsprozesse auch im Dunkeln eine H_2 - Entwicklung bewirken, doch steigt sie im Licht bedeutend an. Für die Beteiligung des Kohlenhydratstoffwechsels an der Photoproduktion von H_2 spricht die gleichzeitige Entwicklung von CO_2

(Frenkel, 1952; Kaltwasser et al., 1969). CO_2 kann sogar in höheren Konzentrationen die Photoevolution von H_2 unterbinden (Healey, 1970 a). Weiterhin wird die H_2 - Entwicklung durch Zugabe von Glucose und Acetat stimuliert (Healey, 1970 a; b). Hemmstoffversuche mit Monofluoracetat und radioaktive Fütterungsversuche zeigen, daß die zur H_2 - Entwicklung notwendigen Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse und dem Citratzyklus stammen (Healey, 1970 a; Kaltwasser et al., 1969).

Es konnte aber bisher noch nicht geklärt werden, welcher Donor die aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammenden Reduktionsäquivalente auf die photosynthetische Membran überträgt. Versuche im zellfreien System mit Chlamydomonasarten deuten eine Beteiligung von NADH an der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung an (Abeles, 1964; Ben - Amotz u. Gibbs, 1975; King et al., 1977 a; b). Doch wurde bei den bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen das Cytoplasma nicht von den photosynthetischen Membranen getrennt. Daher kann eine Metabolisierung von NADH, bevor es seine Elektronen an die photosynthetische Membran abgibt, nicht ausgeschlossen werden. Auch die Frage, welcher Redoxcarrier der photosynthetischen Elektronentransportkette reduziert wird, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Besonders interessant ist hier das Problem der Zugänglichkeit des membrangebundenen Redoxcarriers für

den vermutlich hydrophilen Donor.

Der bisherige Kenntnisstand zur Photoproduktion von H_2 läßt sich in vereinfachender Weise folgendermaßen darstellen (Schema 1).



Schema 1: Schematischer Überblick der Photoproduktion von H_2

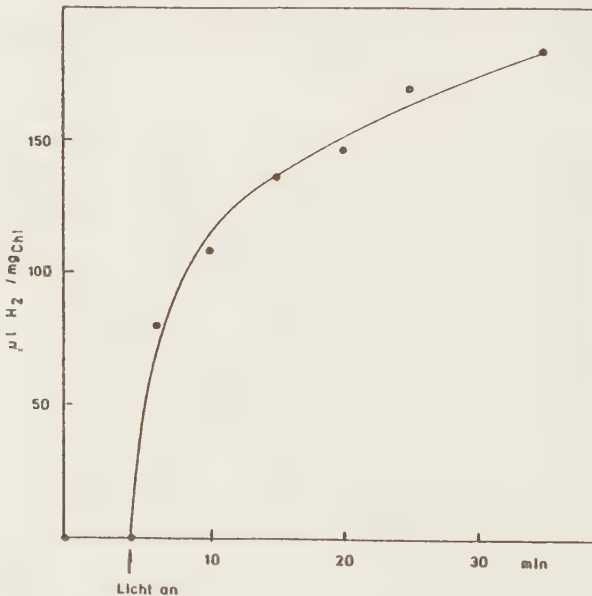
In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob NADH der gesuchte Donor für eine Photosystem I - abhängige H_2 - Entwicklung ist. Dazu wurden photosynthetisch aktive Membranen aus der zellwandlosen Muttante *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 benutzt, die zusammen mit Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* zur photosynthetischen H_2 - Entwicklung fähig waren. Weiterhin stellte sich die Frage, welche Redoxkomponente der photosynthetischen Elektronentransportkette der gesuchte Donor reduziert. Zur Klärung dieser Frage sollten Hemmstoffversuche beitragen. Auch das Problem der Zugänglichkeit der Redoxkomponente für den Donor sollte näher untersucht werden.

Ergebnisse

1. Photoreduktion von H_2 mit intakten Chlamydomonas reinhardi

Vor der Untersuchung der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung in zellfreien System aus Chlamydomonas reinhardi CW - 15, sollte nachgewiesen werden, daß auch intakte

Abbildung 1: Lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit intakten Chlamydomonas reinhardi CW - 15 Zellen



Die H_2 - Entwicklung wurde manometrisch gemessen. Das Reaktionsmedium enthielt 50 mM Tris / HCl pH 7.3, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 μM DCMU, 200 μg Chl. Im Zentralzylinder befanden sich 0.3 ml alkalisches Pyrogallol.

Zellen dieser Mutante wie andere Grünalgen (Healey, 1970 a; b; Kaltwasser et al., 1969; Stuart u. Kaltwasser, 1970, Stuart u. Gaffron, 1971; 1972; Stuart, 1971) zur Photoproduktion von H_2 geeignet sind.

Wie Abbildung 1 zeigt, konnte *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 nach einer Adaptionszeit von 1 h unter anaeroben Bedingungen im Licht H_2 entwickeln. Die Adaptierung an anaerobe Bedingungen ist zur Aktivierung der Hydrogenase notwendig (Klein u. Betz, 1978). Die Messungen wurden bei einer DCMU - Konzentration von $10 \mu M$ durchgeführt. Diese Konzentration des Photosyntheseinhibitors hemmte die O_2 - Entwicklung mit HCO_3^- als Akzeptor vollständig. Die lichtabhängige H_2 - Entwicklung mußte daher auf endogene Elektronendonatoren beruhen, die ihre Reduktionsäquivalente vor Photosystem I an die Elektronentransportkette abgaben. Die Messungen wurden manometrisch durchgeführt. Die Reaktionsgefäße enthielten im Zentralzylinder alkalisches Pyrogallol, das O_2 und CO_2 absorbiert. Das entstehende Gas war daher H_2 . Dies wurde durch eine anschließende gaschromatographische Analyse bestätigt.

2. Isolation und Eigenschaften von photosynthetisch aktiven Partikeln aus Chlamydomonas reinhardi CW - 15

Um ein definiertes, zellfreies System zur Untersuchung der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung zu erhalten, war die Isolation photosynthetisch aktiver Membranen aus Chlamydomonas reinhardi CW - 15 notwendig.

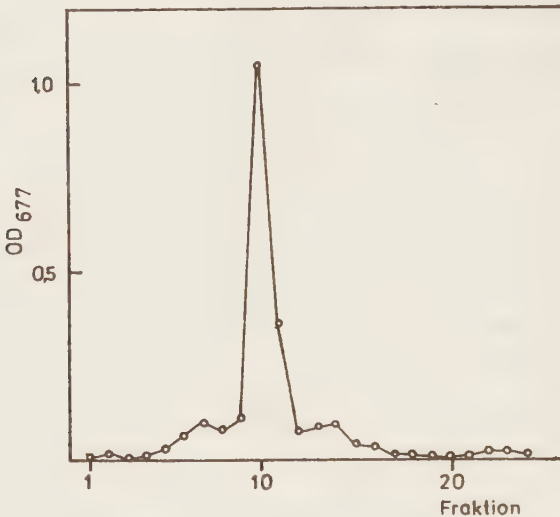
Photosynthetisch aktive Thylakoidmembranen wurden schon aus vielen eukaryotischen Algen isoliert, so aus Chlamydomonas reinhardi (Curtis et al., 1975; Brand et al., 1975; Yannai et al., 1976), Scenedesmus obliquus (Berzborn u. Bishop, 1973), Chlorella sorokiniana (Berzborn u. Bishop, 1973), Euglena gracilis (Wildner u. Hauska, 1974) und aus Bumilieriopsis filiformis (Böger, 1969; Böhme et al., 1978). Die photosynthetisch aktiven Membranen aus Algen zeigen alle hohe Elektronentransportraten, die teilweise durch Zugabe von Entkopplern stimuliert werden (Yannai et al., 1976; Berzborn u. Bishop, 1973; Böhme et al., 1978) und an eine ATP - Bildung gekoppelt sind (Yannai et al., 1976; Böhme et al., 1978; Brand et al., 1975). Die Isolation von photosynthetisch aktiven Partikeln aus Algen wird durch rigide Zellwände erschwert. Es war daher nötig, die Algenzellen zur Isolation von photosynthetischen Membranen mechanisch aufzubrechen, sei es durch Zerschlagen mit Glasperlen (Berzborn u. Bishop, 1973; Böger, 1969; Böhme et al.,

1978), oder mit Ultraschall (Yannai et al., 1976; Brand et al., 1975; Curtis et al., 1975; Wildner u. Hauska, 1974). Ältere Isolationsmethoden beruhen auf dem Zerreiben der Zellen mit Sand (Gorman u. Levine, 1965) oder auf plötzlichem Expandieren in der French - press (Katoh u. San Pietro, 1967).

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Isolation von photosynthetischen Partikeln aus *Chlamydomonas reinhardi* CW - 15 bestand aus dem osmotischen Aufbrechen der Algenzellen. Dieses einfache Verfahren, mit dem Thylakoidmembranen reproduzierbarer photosynthetischer Aktivität erhalten wurden, war möglich, weil *Chlamydomonas reinhardi* CW - 15 keine Zellwand mehr besitzt (Davies u. Plaskitt, 1971). Die in der späten logarithmischen Phase abgeernteten Zellen wurden in einem hypertonen, Sorbit enthaltenden Medium nach Jensen u. Bassham (1966) aufgenommen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem hypotonen Medium ohne Sorbit osmotisch aufgebrochen und zur Entfernung des Cytoplasmas noch zweimal gewaschen.

Die so isolierten *Chlamydomonas*partikel zeigten im Saccharose - Dichtegradienten nach Graham u. Smillie (1971) 6 chlorophyllhaltige Banden, von denen die Dritte über 80 % des Chlorophylls enthielt. Der restliche Chlorophyllgehalt entfiel auf die übrigen 5 Banden (siehe Abb. 2).

Abbildung 2: Auftrennung der Chlamydomonaspartikel
im Saccharose - Dichtegradienten



Der kontinuierliche Gradient von 0.25 - 1.0 M Saccharose wurde nach Graham u. Smillie (1971) mit denen von Surzycki (1969) angegebenen Puffern durchgeführt.

Die Chlamydomonaspartikel konnten mit HCO_3^- als Akzeptor keinen Sauerstoff mehr entwickeln. Sie enthalten daher keine aktiven ganzen Zellen oder intakte Chloroplasten. Photosynthetische Aktivität zeigten die Chlamydomonaspartikel in Gegenwart des Hill - Akzeptors FeCy. FeCy kann als hydrophile Substanz Membranen nicht permeieren und wird von intakten Chloroplasten oder ganzen Zellen nicht reduziert. Die Fähigkeit zur FeCy - Reduktion indizierte daher, daß die Chlamydomonaspar-

tikel aus Thylakoidmembranen bestehen. Die lichtabhängige FeCy - Reduktion mit Chlamydomonaspartikeln wurde durch Zugabe von Entkopplern stimuliert (siehe Abb. 3, 4 und Tab. 1).

Tabelle 1: Einfluß der Sorbitkonzentration des hypertonen Isolationsmediums auf die photosynthetische Aktivität der Chlamydomonaspartikel

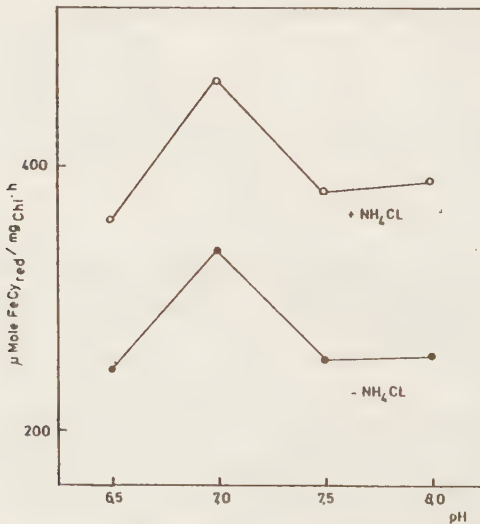
Sorbitkonzentration	Basalrate	entkoppelte Rate
M	μ Mole FeCy _{red} / mg Chl $\cdot$ h	
0.35	330	525
0.5	337	522
0.75	315	397
1.0	300	375

Der Reaktionsansatz enthielt 40 mM Tricin / NaOH pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 1.5 mM FeCy, 40 μ g Chl u. 5 mM NH₄Cl als Entkoppler.

Die photosynthetische Aktivität der Chlamydomonaspartikel wurde von der Osmolarität des hypertonen Mediums wenig beeinflußt. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, hemmten Sorbitkonzentrationen höher als 0.5 M sowohl die Basalrate in Abwesenheit von ADP und P_i als auch die entkoppelte Rate in Gegenwart von NH₄Cl.

Die zu beobachtende stärkere Hemmung der entkoppelten Rate könnte auf einer Inaktivierung des photosynthetischen Elektronentransportes bei gleichzeitiger Entkopplung beruhen. Da sich die Elektronentransportraten von Chlamydomonaspartikeln, die bei 0.35 M oder bei 0.5 M Sorbit im hypertonischen Medium isoliert wurden, nicht voneinander unterschieden, wurden die Chlamydomonaspartikel bei 0.35 M Sorbit isoliert.

Abbildung 3: Einfluß des pH - Wertes des Isolationsmediums auf den photosynthetischen Elektronentransport von Chlamydomonaspartikeln



Gemessen wurde die FeCy - Reduktion durch Extinktionsänderung bei 420 nm. Der Reaktionsansatz enthielt 20 mM Tricin / NaOH pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 1.5 mM FeCy, 40 μ g Chl. u. 5 mM NH_4Cl .

Deutlicher als die Osmolarität des Isolationsmediums beeinflusste sein pH - Wert die photosynthetische Aktivität der Chlamydomonaspartikel. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, hatten die Basalrate und die entkoppelte Rate bei einem pH - Wert des Isolationsmediums von 7.0 ein deutliches Optimum. Höhere und niedrigere pH - Werte des Isolationsmediums erniedrigten die photosynthetische Aktivität der Chlamydomonaspartikel. Sie wurden aus diesem Grunde bei pH 7.0 isoliert.

Die Chlamydomonaspartikel konnten außer FeCy noch MV und in Gegenwart von Ferredoxin Cytochrom c reduzieren (siehe Tab. 2). Die MV - Reduktion wurde als O_2 - Aufnahme gemessen, weil MV autoxidabel ist und sofort mit O_2 reagiert. Eine direkte Reduktion von O_2 durch Photosystem I konnte ebenfalls beobachtet werden, doch betrug sie nur ein Drittel der mit MV katalysierten Reaktion. Photosystem I katalysierte Reaktionen wurden in Gegenwart von DCMU mit einem artifiziellen Elektronendonator für Photosystem I wie DAD, das von Ascorbat reduziert gehalten wurde, gemessen. Photosystem II abhängige Reaktionen, wie die Phenylendiamin katalysierte FeCy - Reduktion wurden in Gegenwart von DBMIB, einem Photosynthesehemmstoff, der den Elektronentransport nach Plastochinon unterbricht (Trebst et al., 1970; Böhme et al., 1971), gemessen.

Auffällig war die geringe Fähigkeit der Chlamydomonaspartikel NADP, den natürlichen Akzeptor des photosynthetischen Elektronentransportes, zu reduzieren.

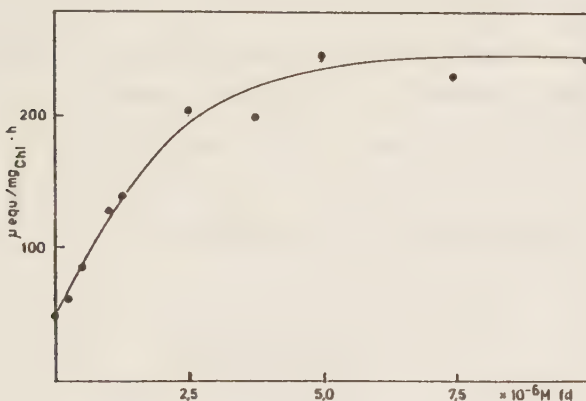
Tabelle 2: Photosynthetischer Elektronentransport in Chlamydomonaspartikeln

Reaktionen		Elektronentransportraten		
Donor	Akzeptor	Basalrate	gekoppelt	entkoppelt
		μ equ / mg Chl $\cdot$ h		
$H_2O \rightarrow FeCy$		173		243
$H_2O \rightarrow O_2$		62.8		
$H_2O \rightarrow MV \rightarrow O_2$		193.6	220.4	247.8
$H_2O \rightarrow NADP$		30		
$H_2O \rightarrow Cyt C$ (+ Ferredoxin)		123.5		
Asc / DAD $\rightarrow$ MV $\rightarrow$ O_2		302.8	316.5	426
$H_2O \rightarrow PD \rightarrow FeCy$ (+ DBMIB)			92	

Das Reaktionsvolumen betrug bei allen Messungen 2 ml. Es enthielt 50 mM Tricin / NaOH pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, wenn vorhanden Natriumascorbat 13 mM, DAD 60 μ M, MV 0.33 mM, P_i 5 mM, ADP 2.5 mM, FeCy 1 mM, Cyt c 0.4 mM, NADP 3 mM, Ferredoxin 100 μ g, Gram. 30 μ g oder 2.5 mM NH_4Cl als Entkoppler, DBMIB 1.5 μ M, DCMU 30 μ M, PD 0.015 mM. Die Ansätze enthielten bei photometrischen Messungen 40 μ g Chl, bei Messungen an der O_2 - Elektrode 100 μ g Chl.

Dies war auch nach Zugabe der Ferredoxin - NADP - Oxidoreduktase aus Spinat nicht möglich. Da die

Abbildung 4: Abhängigkeit der Cytochrom c - Reduktion in Chlamydomonaspartikeln von der Ferredoxin - Konzentration



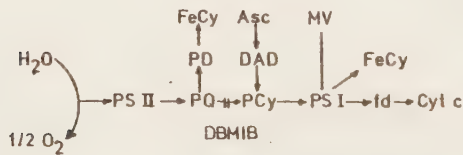
Gemessen wurde die Änderung der Extinktion bei 550 nm. 2 ml Reaktionsmedium enthielten 20 mM Tricin / NaOH pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 0.2 mM Cyt. c, fd u. 20 µg Chl.

NADP - Reduktion Ferredoxin - abhängig ist, könnte dies bedeuten, daß die Chlamydomonaspartikel Ferredoxin nicht reduzierten. Daher wurde untersucht, ob die Cytochrom c - Reduktion wie in Spinachchloroplasten durch Ferredoxin stimuliert wird (Oettmeier u. Lockau, 1973). Wie Abbildung 4 zeigt, war eine Stimulation der Cytochrom c - Reduktion um das Fünffache gegeben. Das Fehlen der NADP - Reduktion konnte also nicht auf die Unfähigkeit der Partikel, Ferredoxin zu redu-

zieren , zurückgeführt werden.

Im Dunkeln wurde mit NADPH und Chlamydomonaspartikeln eine hohe Sauerstoffaufnahme gemessen. Sie betrug 80 μequ / min. Die geringe NADP - Reduktion konnte daher auf dem Verbrauch des im Licht reduzierten NADPH durch eine Oxegenasereaktion beruhen.

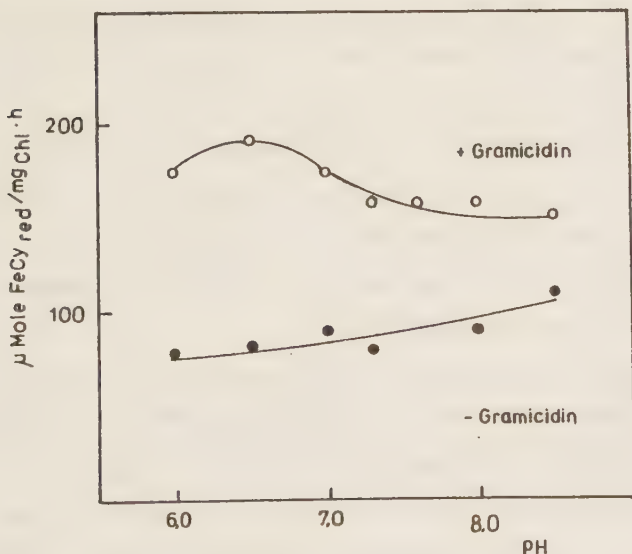
Die von Chlamydomonaspartikeln ausgeführten und gemessenen Elektronentransportreaktionen sind noch einmal in Schema 2 zusammengefaßt.



Schema 2: Nachgewiesene Elektronentransportreaktionen in Chlamydomonaspartikeln

Der photosynthetische Elektronentransport ist bei intakten Thylakoidvesikeln an die Bildung von ATP gekoppelt. Erste Hinweise, daß dies auch bei Chlamydomonaspartikeln der Fall ist, ergaben sich aus der Stimulierung der Elektronentransportraten bei Entkopplerzugabe, wie sie in Tabelle 1 und 2 und in Abbildung 2 und 3 dargestellt ist.

Abbildung 5: Stimulation des photosynthetischen Elektronentransports gemessen als FeCy - Reduktion durch Entkoppler in Abhängigkeit vom pH - Wert des Reaktionsmediums



Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 420 nm. Das Reaktionsmedium enthielt in 2 ml 100 mM Mes / NaOH pH 6.0, 6.5, 100 mM HePes / NaOH pH 7.0, 7.3, 7.5, 100 mM Tricin / NaOH pH 8.0 oder 8.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM FeCy, 30 μg Gram. u. 50 μg Chl.

Entkoppler lösen den Elektronentransport von der Photophosphorylierung. Sie bauen den durch den Elektronentransport geschaffenen pH - Gradienten, der zur Bildung von ATP führt, ab. Die Geschwindigkeit des Elektro-

nentransports kann daher nicht mehr von dem pH - Wert im Innenraum des Thylakoiden kontrolliert werden und der entkoppelte Elektronentransport läuft mit maximaler Geschwindigkeit ab.

Die Stimulation des Elektronentransports durch Entkoppler war bei den Chlamydomonaspartikeln, wie Abbildung 5 zeigt, abhängig vom pH - Wert des Reaktionsmediums. Die stärkste Entkopplerstimulierung war bei pH 6.5 zu beobachten. Bei diesem pH - Wert ist die Basalrate durch den noch tiefer liegenden pH - Wert im Thylakoidinnenraum gehemmt. Mit steigendem pH - Wert des Reaktionsmediums nahm die Basalrate zu, während die entkoppelte Rate abfiel.

Wie aus der Entkopplerstimulierung zu vermuten war, zeigten die Chlamydomonaspartikel eine an den Elektronentransport gekoppelte ATP - Bildung (siehe Tabelle 3). Aus der Elektronentransportrate, die als FeCy - Reduktion gemessen wurde und mit H₂O als Elektronendonator von beiden Photosystemen abhängig war, ergab sich eine Stöchiometrie von ATP zu 2 zu FeCy transportierten Elektronen von 1.1. Für photosynthetisch aktive Membranen aus Algen wurden bisher ATP / 2e - Verhältnisse zwischen 0.33 (Yannai et al., 1976) und 1.02 (Böhme et al., 1978) veröffentlicht. Die Chlamydomonaspartikel sind also durchaus mit anderen Algenchloroplasten, aber auch mit Spinatchloroplasten nach Nelson et al., (1970) zu vergleichen, die in unserem Labor ein durchschnittliches ATP / 2e - Ver-

Tabelle 3: Photophosphorylierung und Elektronen-transport in Chlamydomonaspartikeln

Zugabe zum Reaktions- ansatz	Elektronen- transport $\mu\text{equ}/$ $\text{mg Chl} \cdot \text{h}$	Photophos- phorylierung $\mu\text{Mole ATP} /$ $\text{mg Chl} \cdot \text{h}$	ATP / 2e
+ ADP	158	87.6	1.1
- ADP	194	9.2	
+ Gram.	328	27.5	
+ DBMIB, PD	92	26.7	0.57

Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 420 nm über 6 min und das in dieser Zeit organisch gebundene $^{32}\text{P}_i$. Das Reaktionsmedium enthielt in 2 ml 50 mM Tricin / NaOH pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 5 mM $^{32}\text{P}_i$, 2.5 mM ADP, 1 mM FeCy, 7.5 μg Gram., 0.75 μM DBMIB, 0.075 mM PD u. 50 μg Chl.

hältnis von 1.0 aufweisen. Der theoretische Wert des ATP / 2e - Verhältnisses, der sich aus der Anzahl der pro Elektron in den Thylakoidinnenraum transportierten Protonen und der zur Synthese von einem ATP Protonen abschätzen läßt, wird zwischen 1.33 und 2.0 vermutet (siehe Trebst, 1974; 1978; Hall, 1976).

Die nur von Photosystem II abhängige, von Phenylen-diamin katalysierte Reduktion von FeCy in Gegenwart von DBMIB zeigte ein ATP / 2e - Verhältnis von 0.57

(siehe Tabelle 3). Das entsprach der Hälfte des ATP / $2e^-$ - Verhältnisses, das bei einem Elektronentransport über beide Photosysteme zu erwarten gewesen wäre.

Die Elektronentransportraten wurden durch Entkopplerzugabe stimuliert. Die ATP - Bildung sank deutlich, konnte aber nicht völlig gehemmt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit der hier beschriebenen Methode aus *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 photosynthetisch aktive Membranen isoliert werden konnten, die in ihren wesentlichen Eigenschaften den Typ C - Chloroplasten aus höheren Pflanzen nach der Klassifikation von Hall (1972) entsprechen.

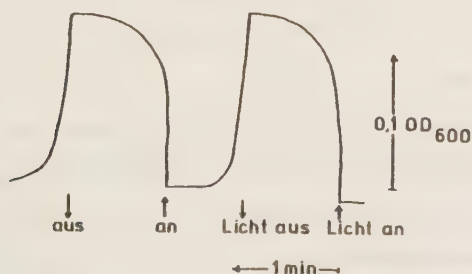
3. Anaerobe Photoreduktion von MV durch Chlamydomonas-partikel

Um im Licht in einem zellfreien System H_2 entwickeln zu können, muß eine Hydrogenase an Thylakoidmembranen gekoppelt werden. Dazu ist ein Mediator nötig, der die Reduktionsäquivalente von Photosystem I auf die Hydrogenase überträgt. Sein Redoxpotential muß positiv genug sein, um von Photosystem I reduziert zu werden, und negativ genug, um Protonen von der Hydrogenase zur H_2 - Bildung umzusetzen. Bisher wurden Ferredoxin und MV als solche Mediatoren benutzt, da sie beide mit Photosystem I und den meisten Hydrogenasen reagieren (siehe Rao u. Hall, 1979; Rao et al., 1978 a; b).

Da beide Mediatoren sehr autoxidabel, aber auch die meisten Hydrogenasen stark O_2 - empfindlich sind, ist eine lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit Chloroplasten und gekoppelter Hydrogenase nur unter anaeroben Bedingungen möglich.

In diesem Abschnitt sollen die Eigenschaften des anaeroben Elektronentransports anhand der MV - Reduktion in Chlamydomonaspartikeln untersucht werden. Weil die Photoproduktion von H_2 auf Kosten des endogenen Donors nur von Photosystem I abhängig ist, wurde auch die anaerobe MV - Reduktion nur in Gegenwart von DCMU auf Kosten eines artifiziellen Elektronendonors untersucht.

Abbildung 6: Anaerobe Photoreduktion von MV in Abwesenheit von DTE



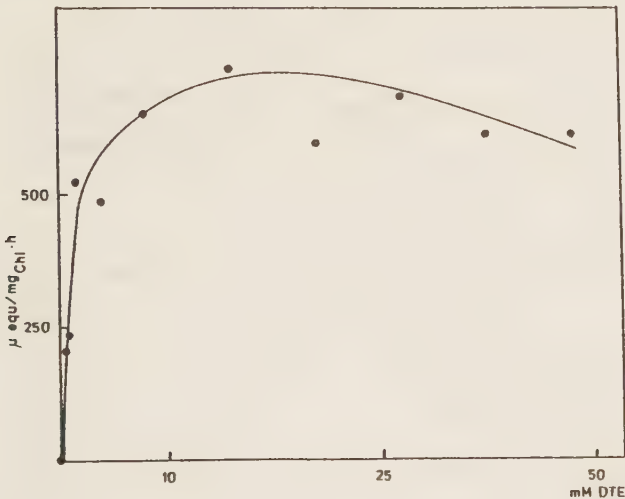
Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 600 nm. Das Reaktionsmedium enthielt in 2 ml 100 mM Tris / HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 30 μg Gram., 30 μM DCMU, 50 mM Natriumascorbat, 2.5 mM MV, 3 mM TMPD und 20 μg Chl.

Wie Abbildung 6 zeigt, war eine Nettophotoreduktion von MV mit dem üblichen Donorsystem, bestehend aus Ascorbat und dem lipophilen Donor für Photosystem I, TMPD, in Chlamydomonaspartikeln nicht möglich. Im Licht trat zwar eine sofortige Reduktion von MV ein, die aber schon nach ca. 30 sec. aufhörte und ein Plateau einnahm. Im Dunkeln wurde das reduzierte MV sofort wieder oxidiert. Dieser Reaktionsverlauf ließ eine Zyklisierung von MV und / oder TMPD um Photosystem I vermuten, die so groß war, daß der nichtzyklische Elektronentransport zu MV bald nach Beginn der Reaktion zum Stillstand kam. Diese Vermutung wurde später durch Phosphorylierungsexperimente bestätigt (siehe Seite 25).

Eine Nettophotoreduktion von MV wurde erst, wie in Abbildung 7 dargestellt ist, durch die Zugabe von DTE möglich. Bei einer Konzentration von 15 mM DTE lief die Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit ab. Auch Hoffmann et al. (1977) und Krasna (1978) konnten eine anaerobe MV - Reduktion nur in Gegenwart von DTE, DTT, NaS_2 und Thioglycolsäure beobachten.

Die Photoreduktion von MV mit Chlamydomonaspartikeln war nicht allein von der DTE - Konzentration abhängig, sondern wurde zusätzlich durch Natriumascorbat stimuliert (siehe Abbildung 8). Die Sättigungskonzentration von Ascorbat war abhängig von dem Donor für Photosystem I. Bei TMPD betrug sie 50 mM.

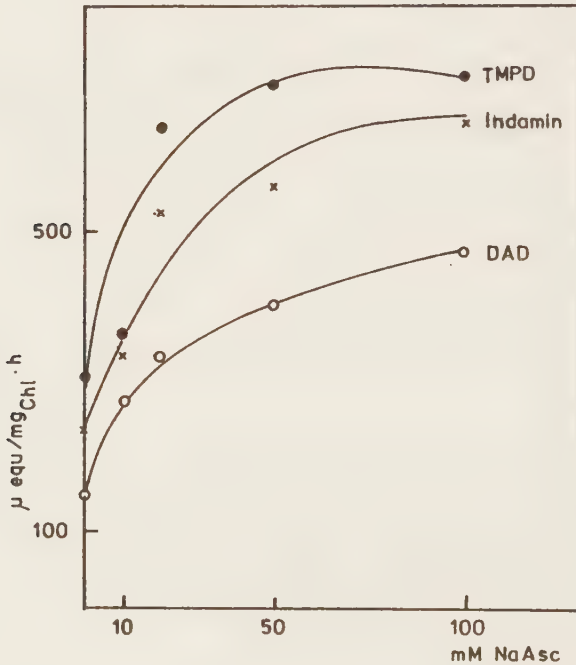
Abbildung 7: Abhängigkeit der anaeroben Photoreduktion von MV von der DTE - Konzentration in Chlamydomonas-partikel



Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 600 nm. Der Reaktionsansatz enthielt in 2 ml 100 mM Tris / HCl pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 50 mM Natriumascorbat, 2.5 mM MV, 30 μg Gram., 30 μM DCMU, 3 mM TMPD, DTE u. 20 μg Chl.

Schon aus dem Versuch ohne DTE als Reduktionsmittel, der in Abbildung 6 dargestellt ist, wurde vermutet, daß der zyklische Elektronentransport eine Konkurrenzreaktion zum linearen Elektronentransport zu MV darstellt. Dies konnte durch Phosphorylierungsexperimente, die in Tabelle 4 dargestellt sind, bestätigt werden. Dazu wurde die Photoreduktion von MV

Abbildung 8: Abhängigkeit der anaeroben Photoreduktion von MV von der Natriumkonzentration bei verschiedenen Donatoren für Photosystem I



Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 600 nm. Der Reaktionsansatz enthielt in 2 ml 100 mM Tris / HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 30 μM DCMU, 30 μg Gram., 3 mM TMPD, 3 mM DAD oder 0.75 mM Indamin, 10 mM DTE u. 20 μg Chl.

bei variierenden Konzentrationen von DTE, mit Ascorbat / DAD als Donorsystem in Anwesenheit von DCMU im Ver-

Tabelle 4: Photoreduktion von MV und Photophosphorylierung in Chlamydomonaspartikel bei unterschiedlichen DTE - Konzentrationen in Anwesenheit des Donorsystems DAD / Ascorbat

DTE - Kon-	Anaerobe Photo-	Anaerobe Photo-	ATP / 2e
zentration	reduktion von MV	phosphorylierung	
mM	$\mu\text{equ}/$ mg Chl $\cdot$ h	μ Mole ATP/ mg Chl $\cdot$ h	
0	0	75.5	
2	43.8	85.2	3.9
5	51.6	78.1	3.0
10	53.4	76.1	2.8
20	72.6	86.6	2.4

Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 600 nm über 3 min und das nach dieser Zeit organisch gebundene $^{32}\text{P}_i$. Der Reaktionsansatz umfaßte 2 ml und enthielt 50 mM Tricin / NaOH pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 30 μM DCMU, 10 mM Natriumascorbat, 3 mM MV und 50 μg Chl.

gleich zur gekoppelten ATP - Bildung bestimmt. Die Photophosphorylierung blieb unbeeinflusst von der DTE - Konzentration. Sie war ohne DTE mit 75.5 μ Molen ATP / mg Chl $\cdot$ h unwesentlich geringer als die Rate von 86.6 μ Molen ATP / mg Chl $\cdot$ h, die bei einer Konzentration von 20 mM DTE erhalten wurde. In Abwesenheit von

DTE wurde die Photophosphorylierung nur von dem zyklischen Elektronentransport um Photosystem I getragen. Die Photoreduktion von MV wurde dagegen deutlich von der DTE - Konzentration beeinflußt. Ohne DTE war eine Netto-reduktion von MV über längere Zeit und in größerem Maße nicht zu beobachten (siehe auch Abbildung 6). In Gegenwart von 20 mM DTE betrug der Elektronentransport zu MV $72.6 \mu \text{ equ} / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$. Doch war der zyklische Elektronentransport auch bei diesen hohen Konzentrationen an DTE nicht zu vernachlässigen. Das ATP / $2e^-$ - Verhältnis betrug bei 20 mM DTE noch 2.6. Es war damit fünfmal so hoch, wie bei einem linearen Elektronentransport, der nur ein Photosystem einschließt, zu erwarten wäre. Man kann daher abschätzen, daß nur 20 - 30 % der von Photosystem I angeregten Elektronen zur Reduktion von MV beitrugen.

4. Photosynthetische H_2 - Entwicklung mit Chlamydomonaspartikel, gekoppelter Clostridienhydrogenase und artifiziellm Donorsystem

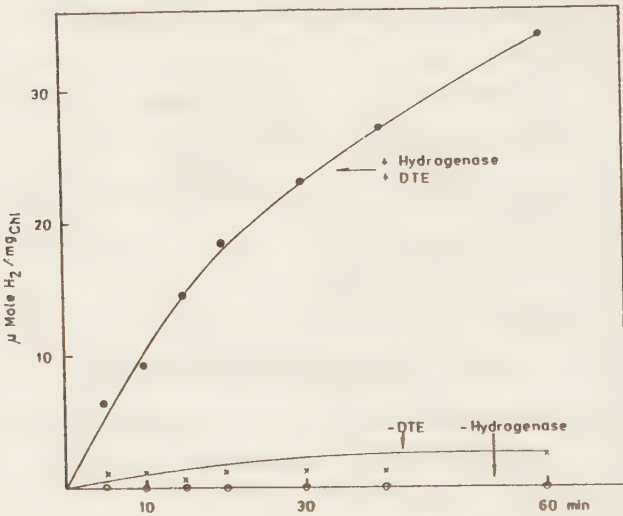
Da die Chlamydomonaspartikel beide Mediatoren, MV und Ferredoxin reduzierten, war zu erwarten, daß sie an eine Hydrogenase gekoppelt werden und im Licht H_2 entwickeln können. Als Elektronendonator für Photosystem I wurde zunächst das artifizielle System, bestehend aus Ascorbat / TMPD mit DTE als Reduktionsmittel, eingesetzt. Als Hydrogenase wurde nicht die Hydrogenase

aus *Chlamydomonas reinhardi* eingesetzt, deren Anreicherung aus einem zellfreien Extrakt erst gegen Ende der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde (Erbes et al.; 1979), sondern ein Rohextrakt aus *Clostridium pasteurianum* mit Hydrogenaseaktivität. Die Ankopplung dieser Hydrogenase an Chloroplasten wurde schon oft durchgeführt (Benemann et al., 1973; Rao et al., 1976; Fry et al., 1977; Hoffmann et al., 1977). Sie brachte im Vergleich zu anderen Hydrogenasen die höchsten Raten in der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung (Rao et al., 1978 a; b; Rao u. Hall, 1979; Ben - Amotz u. Gibbs, 1975).

Auch *Chlamydomonas*spartikel konnten mit Clostridienhydrogenase und dem artifiziellen Donorsystem DTE / Ascorbat / TMPD in Anwesenheit von MV als Mediator im Licht H_2 entwickeln (siehe Abbildung 9). Ohne Zugabe von Clostridienhydrogenase wurde keine H_2 - Entwicklung beobachtet. Nur geringe Mengen H_2 waren in Anwesenheit von DTE zu messen. Die Photoevolution von H_2 war in den ersten 10 min konstant und lag mit einer sehr guten Aktivität von $60 \mu\text{Molen } H_2 / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$ noch immer unter den Elektronentransportraten, die unter anaeroben Bedingungen bei Photosystem I abhängigen Reaktionen erhalten werden.

*Chlamydomonas*spartikel wurden auch über Ferredoxin, wie Abbildung 10 zeigt, an die Clostridienhydrogenase gekoppelt. Die Raten in der lichtabhängigen H_2 -

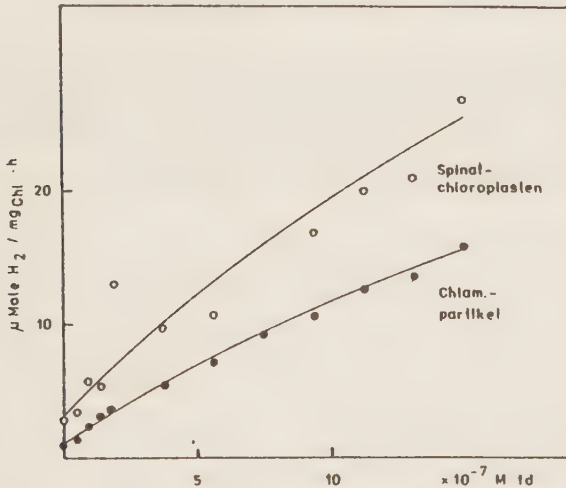
Abbildung 9: Lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit Chlamydomonaspartikeln, DTE / Ascorbat / TMPD als Donorsystem für Photosystem I und einer über MV gekoppelten Clostridienhydrogenase



Die H_2 - Entwicklung wurde manometrisch bei $20^\circ C$ gemessen. Das Reaktionsmedium enthielt in 2 ml 100 mM Hepes / NaOH pH 7.0, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM DTE, 10 mM Natriumascorbat, 3 mM TMPD, 30 μM DCMU, 30 μg Gram., 50 μl Rohextrakt von *Clostridium pasteurianum* u. 100 μg Chl. Die Proben wurden vor der Belichtung 20 min mit N_2 techn. begast.

Entwicklung mit Ferredoxin als Mediator waren deutlich geringer als die Raten mit MV als Mediator. Sie waren weder bei Spinatchloroplasten noch bei Chlamydomonas-

Abbildung 10 : Photoevolution von H_2 mit Spinatchloroplasten und Chlamydomonaspartikeln mit gekoppelter Clostridienhydrogenase in Abhängigkeit von der Ferredoxin - Konzentration



Zum Reaktionsansatz siehe Abbildung 9. Die Messung wurde gaschromatographisch durchgeführt.

partikeln mit Ferredoxin gesättigt. Nach Packer u. Cullingford (1978) liegt der Sättigungsbereich bei $4 \cdot 10^{-4}$ M Ferredoxin.

Aus den Ergebnissen, die in diesem Abschnitt dargestellt sind, geht hervor, daß Chlamydomonaspartikel wie Chloroplasten aus höheren Pflanzen über MV oder Ferredoxin an eine Clostridienhydrogenase gekoppelt werden und im Licht H_2 entwickeln können. Es sollten

daher auch andere Donorsysteme eingesetzt werden können, die zur Identifizierung des endogenen Donors für die Photoproduktion von H_2 in Gegenwart von DCMU führen können.

5. Photoproduktion von H_2 auf Kosten eines endogenen Donors im zellfreien System mit Chlamydomonaspartikeln und angekoppelter Clostridienhydrogenase

Aus früheren Arbeiten (Kaltwasser et al., 1969; Healey 1970 a; b) ist eine Beteiligung des Kohlenhydratstoffwechsels, insbesondere der Glykolyse und des Citratzyklus, an der Photoevolution von H_2 bekannt.

Eine zentrale Rolle in der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung scheint NADH zu spielen (Abeles, 1964; Ben-Amotz u. Gibbs, 1975; King et al., 1977 a; b).

Um weitere Hinweise auf die Identität des endogenen Donors zu erhalten, der die Reduktionsäquivalente aus dem Kohlenhydratstoffwechsel direkt auf die photosynthetische Elektronentransportkette überträgt, wurden verschiedene Elektronendonatoren in einem zellfreien System eingesetzt. Dieses System war analog zur intakten Zelle aufgebaut und bestand aus Chlamydomonaspartikeln mit angekoppelter Clostridienhydrogenase und aus Cytoplasmamaterial. Als Elektronendonatoren wurden zunächst Intermediate der Glykolyse wie Glucose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, 3-Phospho-

glycerinsäure, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat und Lactat eingesetzt. Um ihre Metabilisierung zu dem eigentlichen Donor zu gewährleisten, enthielt der Reaktionsansatz cytoplasmatisches Material, das nach dem osmotischen Aufbrechen der Algenzellen freigesetzt und durch Zentrifugation von den photosynthetischen Membranen abgetrennt worden war. Der Rohextrakt wurde mit einem kombinierten Säure - Hitze - Schritt nach Zähringer (1973) und van Lin (1977) gereinigt. Dabei wurde die Hydrogenaseaktivität von der Pyruvat - Ferredoxin - Oxidoreduktase befreit, die in Anwesenheit von Pyruvat den Mediator Ferredoxin reduziert hätte. Mit reduziertem Ferredoxin wäre die H_2 - Entwicklung schon im Dunkeln möglich. Bei dem Einsatz artifizieller Donatoren, die von dem Rohextrakt nicht metabolisiert werden, war eine solche Reinigung nicht nötig. Ferredoxin wurde durch die Säure - Hitze - Behandlung nicht aus dem Enzymextrakt entfernt (siehe van Lin, 1977).

Die mit den Intermediaten der Glykolyse erhaltenen Raten in der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung im zellfreien System mit Chlamydomonaspartikeln in Anwesenheit von DCMU sind in Tabelle 5 dargestellt. Fructose-1,6-bisphosphat und Lactat unterhielten die Photoevolution von H_2 . 3-Phosphoglycerinsäure, Pyruvat und Phosphoenolpyruvat waren als Elektronendonatoren für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung nicht geeignet. Mit Glucose-6-phosphat wurde zwar eine H_2 - Entwick-

Tabelle 5: Verschiedene Elektronendonatoren für die H_2 - Entwicklung im zellfreien System mit Chlamydomonaspartikel

Zugaben zum Reaktions-	H_2 - Entwicklung	
medium	Dunkel	Licht
	μ Mole H_2 / h	
Überstand		
+ G-6-P	0.54	0.42
+ F-1,6-P	0.05	0.68
+ 3-PGS	0	0
+ PEP	0	0
+ Pyr	0	0
+ Lactat	0	0.44
Puffer		
+ G-6-P	0	0.2
+ F-1,6-P	0	0.37
+ Lactat	0	0

Gemessen wurde die H_2 - Konzentration gaschromatographisch. Das Reaktionsmedium enthielt in 2 ml 1ml Überstand nach dem osmotischen Aufbrechen der Chlamydomonaszellen oder 1 ml Aufbrechpuffer, 10 mM $MgCl_2$, 30 μ M DCMU, 3 mM NAD, 3 mM ADP, 5 mM Na_3AsO_4 , 20 mM G-6-P, bzw. F-1,6-P, 3-PGS, PEP, Pyr. oder Lactat, 200 μ g Chl. Alle Proben enthielten 0.1 ml gereinigter Hydrogenase. Die Proben wurden 60 min im Wasserbad bei 20° C unter Schütteln belichtet. Die Dunkelproben wurden mit Alufolie abgedeckt.

lung beobachtet, doch war diese nicht lichtabhängig.

Die Ergebnisse erlaubten folgende Interpretation. Fructose-1,6-bisphosphat und Lactat werden vom Cytoplasma entweder zu 3-Phosphoglycerinsäure oder zu Pyruvat oxidiert. Dabei wird NAD, das dem Reaktionsmedium zugesetzt war, zu NADH reduziert. NADH seinerseits gibt die Reduktionsäquivalente direkt oder indirekt an die photosynthetische Elektronentransportkette ab. 3-Phosphoglycerinsäure, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat, die kein NAD reduzieren können, sind deshalb auch als Donatoren für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung ungeeignet. Zur Interpretation der H_2 - Entwicklung im Dunkeln mit Glucose-6-phosphat bietet sich folgende Erklärung an. Würde Glucose-6-phosphat wie Fructose-1,6-bisphosphat glykolytisch abgebaut werden, so sollte es über NADH die lichtabhängige H_2 - Entwicklung unterhalten können. Dies ist aber nach den Ergebnissen in Tabelle 5 nicht der Fall. Glucose-6-phosphat kann aber auch über den oxidativen Hexose - phosphat - Pentosephosphat - Weg zu Phosphogluconat und NADPH abgebaut werden, und so die zur H_2 - Entwicklung notwendigen Reduktionsäquivalente liefern. Dies stünde aber nicht mit den Ergebnissen von Kaltwasser et al., (1969) und Healey (1970 a) im Einklang, die auch für die H_2 - Entwicklung im Dunkeln eine Beteiligung der Glykolyse und des Citratzyklusses annehmen.

Tabelle 6: Cofaktoren für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung im zellfreien System mit Chlamydomonas-partikeln und Fructose-1,6-bisphosphat als Elektromendonator

Zugaben zum Reaktionsmedium	Photoevolution von H_2 μ Mole H_2 / h
F-1,6-P	0.007
+ NAD	0.04
+ NAD, ADP	0.03
+ NAD, ADP, AsO_4^{3-}	0.096
+ + NAD, ADP, AsO_4^{3-} , Gram.	0.115
+ NAD, ADP, AsO_4^{3-} , fd	0.187

Die H_2 - Konzentration in der Gasphase wurde gaschromatographisch bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt in 2 ml 10 mM $MgCl_2$, 30 μ M DCMU, 20 mM F-1,6-P, 3 mM NAD, 3 mM ADP, 5 mM Na_3AsO_4 , 60 μ l gereinigte Hydrogenase, 1 ml Überstand nach dem Aufbrechen der Algenzellen, 15 μ g Gram, 100 μ g fd und 0.2 mg Chl.

Wie Tabelle 5 zeigt, war für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung Algencytoplasma nötig. Die geringen Raten, die ohne Cytoplasma erhalten wurden, lassen sich auf die Abhängigkeit von glycolytischen Enzymen im gereinigten Rohextrakt von *Clostridium pasteurianum* zurückführen.

Die lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit Fructose-1,6-bisphosphat als Elektronendonator wurde genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Fructose-1,6-bisphosphat war alleine nicht in der Lage, die lichtabhängige H_2 - Entwicklung zu unterhalten. Sie wurde erst durch Zugabe von NAD zum Reaktionsmedium deutlich meßbar. Eine weitere Stimulierung erfolgte durch die Zugabe von ADP und AsO_4^{3-} , dem Entkoppler der Substratkettenphosphorylierung. Gramacidin, das die Photophosphorylierung entkoppelt, hatte nur einen geringen Effekt auf die H_2 - Entwicklung. Obwohl der Clostridienextrakt noch Ferredoxin enthielt, steigerte die Zugabe von Spinatferredoxin nochmals die Photoevolution von H_2 . Diese Ergebnisse legten eine Beteiligung von NADH an der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung nahe.

Um die Rolle, die NADH bei der Photoproduktion von H_2 spielt, näher zu untersuchen, wurde NADH direkt als Elektronendonator für die H_2 - Entwicklung mit Chlamydomonaspartikeln und angekoppelter Clostridienhydrogenase eingesetzt. Wie Tabelle 7 zeigt, war auch mit NADH als Elektronendonator im Licht eine H_2 - Entwicklung zu beobachten. Die H_2 - Entwicklung war nicht mehr vom Zusatz cytoplasmatischen Materials abhängig. Eine Metabolisierung von NADH durch das Cytoplasma kann daher ausgeschlossen werden. Gramacidin beschleunigte die lichtabhängige H_2 - Entwicklung nur wenig. Die Abhängigkeit der H_2 - Entwicklung von der NADH - Konzen-

Tabelle 7: NADH als Elektronendonator für die H_2 -
Entwicklung im zellfreien System mit Chlamydomonas-
partikeln

Zugabe zum Reaktionsmedium	H_2 - Entwicklung	
	Dunkel	Licht
	μ Mole H_2 / h	

Überstand

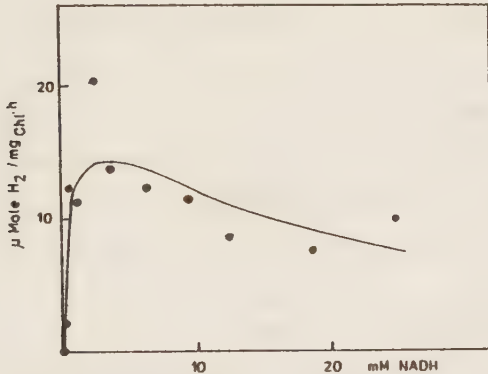
+ NADH, ADP, AsO_4^{3-} , Gram	0.06	1.02
----------------------------------	------	------

Puffer	0	0.15
+ NADH	0	0.64
+ NADH, ADP	0	0.69
+ NADH, ADP, AsO_4^{3-}	0	0.59
+ NADH, ADP, AsO_4^{3-} , Gram.	0	1.08
+ NADH, Gram	0 1.0	1.03

Die H_2 - Konzentration in der Gasphase wurde gaschromatographisch bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt in 2 ml 1 ml Puffer zum Aufbrechen der Algenzellen oder 1 ml Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen, 10 mM $MgCl_2$, 30 μ M DCMU, 12.5 mM NADH, 3 mM ADP, 5 mM $Na_3AsO_4^{3-}$, 15 μ g Gram, 0.1 ml gereinigte Hydrogenase u. 0.2 mg Chl.

tration ist in Abbildung 11 dargestellt. Die lichtabhängige H_2 - Entwicklung war bei 2.5 mM mit NADH gesättigt.

Abbildung 11: Abhängigkeit der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung im zellfreien System mit Chlamydomonas-partikeln und angekoppelter Clostridienhydrogenase von der NADH - Konzentration



Die H_2 - Konzentration wurde gaschromatographisch bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt in 2 ml 100 mM Hepes / NaOH pH 7.0, 10 mM $MgCl_2$, 30 μ M DCMU, 30 μ g Gram., 0.3 ml gereinigte Hydrogenase u. 0.2 mg Chl.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes brachten Hinweise, daß NADH direkter Elektronendonator für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung ist. Wenn man eine Metabolisierung von NADH durch den gereinigten Clostridienextrakt ausschließen kann, so muß NADH seine Elektronen direkt an die photosynthetische Elektronentransportkette abgeben. Das dies der Fall ist, sollen die nächsten Abschnitte dieser Arbeit zeigen.

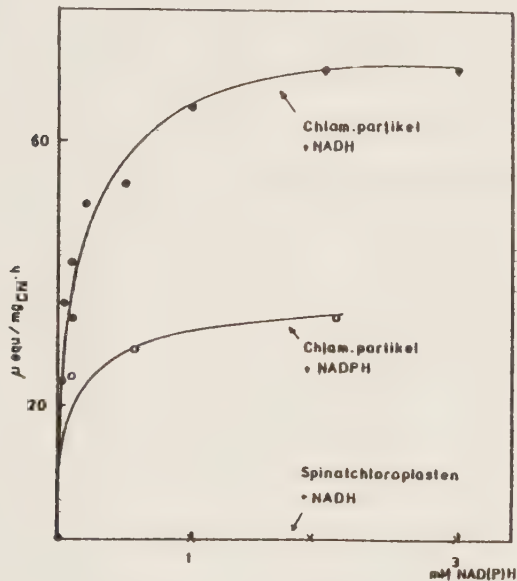
6. NADH als Elektronendonator für Photosystem I in Chlamydomonaspartikeln

Ist NADH tatsächlich Donor für Photosystem I, so sollte es nicht nur die Photoevolution von H_2 unterhalten. Es müßte auch Elektronendonator für andere von Photosystem I katalysiert Reaktionen sein, wie z.B. die MV-katalysierte O_2 -Aufnahme und die Ferredoxin - abhängige Cytochrom c - Reduktion. Abbildung 12 zeigt, daß in Gegenwart von DCMU mit NADH als Donor MV-katalysierte O_2 -Aufnahme gemessen werden konnte. Die Photoreduktion von MV war bei ungefähr 2 mM mit NADH gesättigt.

Ein Vergleich zu NADPH zeigte, daß eine lichtabhängige O_2 - Aufnahme auch mit NADPH als Donor zu beobachten war. Doch war die NADPH - abhängige Rate bedeutend niedriger als die Rate, die mit NADH erhalten wurde. Weiterhin wurde mit NADPH und Chlamydomonaspartikeln schon im Dunkeln eine hohe O_2 - Aufnahme beobachtet. Sie lag bei $80 \mu\text{equ} / \text{min}$ und stieg im Licht in Gegenwart von DCMU auf $109 \mu\text{equ} / \text{min}$ an. NADH wurde im Dunkeln nicht von Chlamydomonaspartikeln oxidiert. Es ist daher anzunehmen, daß NADH spezifischer Donor für Photosystem I in Chlamydomonaspartikeln ist, NADPH aber vermutlich über die Reduktase oxidiert wird.

NADH diente auch als Donor für die von Photosystem I abhängige Cytochrom c - Reduktion in Chlamydomonaspartikeln. Die Rate betrug $41.5 \mu\text{equ} / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$ und

Abbildung 12: Abhängigkeit der MV - Katalysierten O_2 - Aufnahme in Gegenwart von DCMU von der NADH bzw. NADPH - Konzentration



Gemessen wurde die O_2 - Aufnahme in der O_2 - Elektrode. Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml 60 mM Hepes / NaOH pH 7.0, 6 mM $MgCl_2$, 30 μM DCMU, 45 μg Gram. 0.1 mM MV, 0.5 mM NaN_3 , 100 μg Chl, NADH u. NADPH.

konnte durch Zugabe von 100 μg Spinatferredoxin auf 63.4 $\mu equ / mg Chl \cdot h$ stimuliert werden.

NADH konnte also von Chlamydomonaspartikeln im Licht oxidiert werden und diente als Elektronendonator für den Photosystem I abhängigen Elektronentransport. Von Spinatchloroplasten wurde NADH im Licht nicht oxidiert (siehe Abbildung 12).

Tabelle 8: Hemmstoffe der Photooxidation von NADH durch Chlamydomonaspartikel

Hemmstoff	Konzentration M	Elektronentransportrate	
		ungehemmt	gehemmt
		$\mu\text{equ} / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$	
HgCl ₂	$1.5 \cdot 10^{-3}$	103.8	22.2
EDAC	$1.0 \cdot 10^{-3}$	80.6	37.6
DBMIB	$3.0 \cdot 10^{-6}$	95.6	21.2
DNP-INT	$5.0 \cdot 10^{-6}$	94	6.0
Antimycin	$2.5 \cdot 10^{-5}$	93	93
Rotenon	$3.0 \cdot 10^{-5}$	99.4	66.2
	$1.2 \cdot 10^{-4}$		43.0
Amytal	$3.0 \cdot 10^{-3}$	112.6	72.9
	$6.0 \cdot 10^{-3}$		46.4

Gemessen wurde die O₂ - Aufnahme in der O₂ - Elektrode. Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml 60 mM Hepes / NaOH pH 7.0, 6 mM MgCl₂, 30 μM DCMU, 45 μg Gram., 2 mM NADH, 0.5 mM NaN₃, 0.1 mM MV u. 75 oder 100 μg Chl.

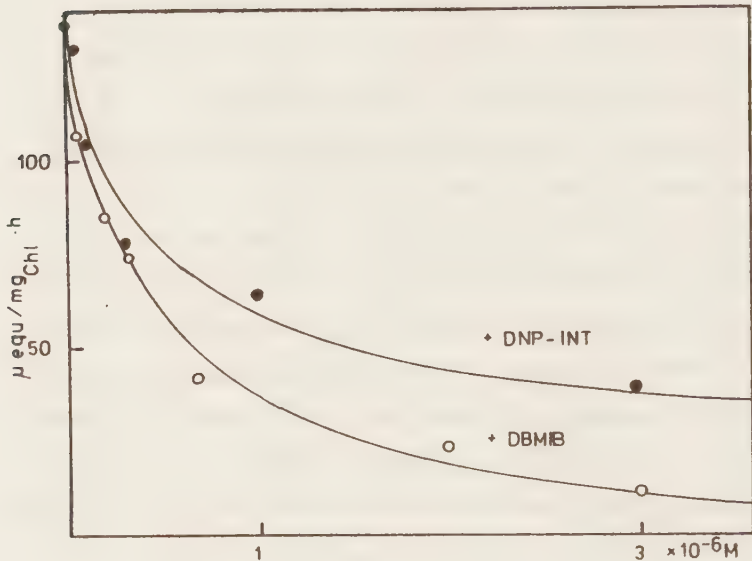
Die Tatsache, daß NADH nur von Thylakoidmembranen eines Organismus oxidiert werden kann, der auch eine lichtabhängige H₂ - Entwicklung zeigt, unterstreicht die physiologische Bedeutung der NADH - Photooxidation.

Um festzustellen, welche Redoxkomponenten der Elektro-

nenstransportkette an der NADH - Photooxidation beteiligt sind, wurden Hemmstoffversuche durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 8 dargestellt sind. So hemmte HgCl_2 , das Plastocyanin blockiert (Kimimura u. Katoh, 1972; 1973), die Photooxidation von NADH. Plastocyanin scheint deshalb am Elektronentransport von NADH zu Photosystem I beteiligt zu sein. Auch EDAC, von dem McCarty (1974) annimmt, daß es den Elektronentransport zwischen Plastocyanin und Cytochrom f unterbricht, hemmte den Elektronentransport mit NADH als Donor. Der Elektronentransport von NADH zu Photosystem I schließt auch Plastochinon ein. Dies ging aus Hemmstoffversuchen mit DBMIB und DNP - Jodnitrophenol hervor. Beide Hemmstoffe unterbrechen den Elektronentransport nach Plastochinon (Böhme et al., 1971; Trebst et al., 1978). Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der NADH - Photooxidation mit beiden Inhibitoren ist in Abbildung 13 dargestellt. Auch Ben-Amotz u. Gibbs (1975) stellten eine Hemmung der lichtabhängigen H_2 - Produktion im zellfreien System mit NADH fest. Antimycin, das Cytochrom b_{563} und damit den zyklischen Elektronentransport über Ferredoxin hemmt (Tagawa et al., 1963; Gimmler, 1977), hatte keinen Einfluß auf den Elektronentransport mit NADH als Donor.

Überraschende Ergebnisse ergaben sich mit Rotenon und Amytal. Sie sind als Hemmstoffe der NADH - Oxidation

Abbildung 13: Hemmung der NADH - Photooxidation in Chlamydomonaspartikel durch DBMB und DNP - INT



Zur Meßmethode siehe Abbildung 12.

durch Komplex I in Mitochondrien bekannt (Galante u. Hatefi , 1978; Hatefi, 1978; Singer u. Edmondson, 1978; Slater, 1967), aber nicht als Inhibitoren des photosynthetischen Elektronentransports (siehe Izawa, 1977). Rotenon und Amytal hemmten die NADH - Photooxidation in Chlamydomonaspartikeln zu 60 % .

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß NADH Elektronendonator für Photosystem I in Chlamydomonaspartikeln ist. Der Elektronentransport von NADH zu Photosystem I läuft über Plastochinon und Plastocyanin. Die Hemmung

Tabelle 9: NADH als Donor für Photosystem I in
NH₂OH - behandelten Chlamydomonaspartikeln

Zugabe zum Reaktionsmedium	Elektronentransportrate µequ / mg Chl • h
-	23.6
+ 2 mM NADH	89.8
+ 30 µM DCMU	73.2
+ 0.5 uM DBMIB	7.2

-	22.8
+ 2 mM NADH	66.0
6 mM NADH	88.8
+ 30 µM DCMU	76.2
+ 1 uM DNP - INT	7.2

-	43.6
+ 2.5 mM NaAsc, 0.16 mM	
Benzidin	69.8
+ 30 µM DCMU	13.2

-	26.6
+ 2.5 mM NaAsc, 16.6 uM DAD	164.6
+ 30 µM DCMU	164.6
+ 0.5 µM DBMIB	164.6

Zur Meßmethode siehe Abbildung 12. Die NH₂OH - Behandlung ist im methodischen Teil beschrieben.

der NADH - Photooxidation durch Rotenon und Amytal macht die Beteiligung einer weiteren Komponente am Elektronentransport von NADH zu Photosystem I wahrscheinlich. Diese Komponente sollte sich analog zur Elektronentransportkette in Mitochondrien vor Plastochinon befinden und die Reduktion von Plastochinon durch NADH ermöglichen. Es ist anzunehmen, daß diese Komponente Chloroplasten höherer Pflanzen fehlt. Denn diese sind weder in der Lage, im Licht NADH zu oxidieren, noch wird ihr Elektronentransport durch Rotenon oder Amytal gehemmt (siehe Izawa, 1977).

Die bisherigen Versuche wurden immer in Gegenwart von DCMU durchgeführt. Versuche von Stuart (1971) legten nahe, daß bei der Photoproduktion von H_2 Reduktionsäquivalente aus dem Kohlenhydratstoffwechsel vor Photosystem II an die Elektronentransportkette abgegeben werden. Dies wäre aber bei den bisherigen Versuchen, in denen Photosystem II blockiert war, nicht festzustellen gewesen. Daher sollte überprüft werden, ob NADH in Chlamydomonaspartikeln auch Donor für Photosystem II ist. Um die hohen Elektronentransportraten mit H_2O als natürlichem Elektronendonator zu verringern, wurden die Chlamydomonaspartikel mit NH_2OH behandelt. Die NH_2OH - Behandlung hemmt die Wasserspaltung (Izawa et al., 1969). In den NH_2OH - behandelten Chlamydomonaspartikel wurde die Empfindlichkeit der NADH - Photooxidation gegenüber DCMU überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Wie erwartet zeigte sich in den Kontrollversuchen, daß der Elektronentransport mit Photosystem II - Donatoren wie Benzidin durch DCMU gehemmt wurde. Photosystem I Reaktionen mit Ascorbat / DAD als Donorsystem wurden weder durch DCMU noch durch DBMIB gehemmt. DCMU hatte auch auf die NADH - Photooxidation keinen Einfluß. Die geringe Hemmung der Elektronentransportrate nach DCMU - Zugabe läßt sich auf die Hemmung von Photosystem II zurückführen, das vorher noch in geringem Maße Elektronen aus der Wasserspaltung bezog. Dagegen wurde der Elektronentransport durch DBMIB und durch DNP - Jodnitrothymol, wie Tabelle 8 darstellt, gehemmt. Es kann also ausgeschlossen werden, daß unter den gezeigten Versuchsbedingungen NADH Donor für Photosystem II in Chlamydomonaspartikeln ist.

7. Isolation einer Komponente aus Chlamydomonaspartikeln, die die NADH - Photooxidation in Ultraschallpartikeln rekonstituierte

Schon die Hemmung der NADH - Photooxidation durch Rotenon und Amytal macht eine direkte Reduktion von Plastochinon durch NADH unwahrscheinlich. Es wurde daher vermutet, daß in Chlamydomonaspartikeln ein Faktor vorhanden ist, der analog zum Komplex I aus Mitochondrien, Plastochinon reduzieren kann. Wenn diese Argumentation richtig ist, so sollte der Faktor auch unter bestimm-

ten Bedingungen von der photosynthetischen Membran der Chlamydomonaspartikel entfernt werden können. Die Chlamydomonaspartikel wären dann nicht mehr in der Lage, NADH zu oxidieren. Durch Zugabe dieses Faktors zu den Chlamydomonaspartikeln sollte ihre Fähigkeit zur NADH - Oxidation wieder rekonstituiert werden.

Wie Tabelle 10 zeigt, gelang der Versuch Chlamydomonaspartikel so zu behandeln, daß sie ihre Fähigkeit zur NADH - Photooxidation verlieren nur unvollkommen. Eine Ultraschallbehandlung bei hohen Chlorophyllkonzentrationen brachte keinen Erfolg. Die NADH - Photooxidation wurde noch begünstigt. Erst durch langes Beschallen bei niedrigen Chlorophyllkonzentrationen und durch Behandlung mit 0.5 % oder 1 % Digitonin wurden Partikel erhalten, die nur noch geringe oder keine Elektronentransportraten mehr mit NADH zeigten. Die Zugabe von Plastocyanin, das bei diesen Behandlungen verloren geht (Sane u. Hauska, 1972), stimulierte die Photooxidation von NADH nur wenig. Dagegen wurde der Elektronentransport mit DAD als Donor für Photosystem I deutlich beschleunigt. Es war daher anzunehmen, daß diese Partikel außer Plastocyanin auch die Komponente verloren hatten, die für die NADH - Oxidation verantwortlich war.

NADH wird leicht durch freies Chlorophyll, das sich in organischen oder Detergenzien enthaltenden Lösungen befindet, oxidiert (Krasnovsky, 1979; Krasnovsky et

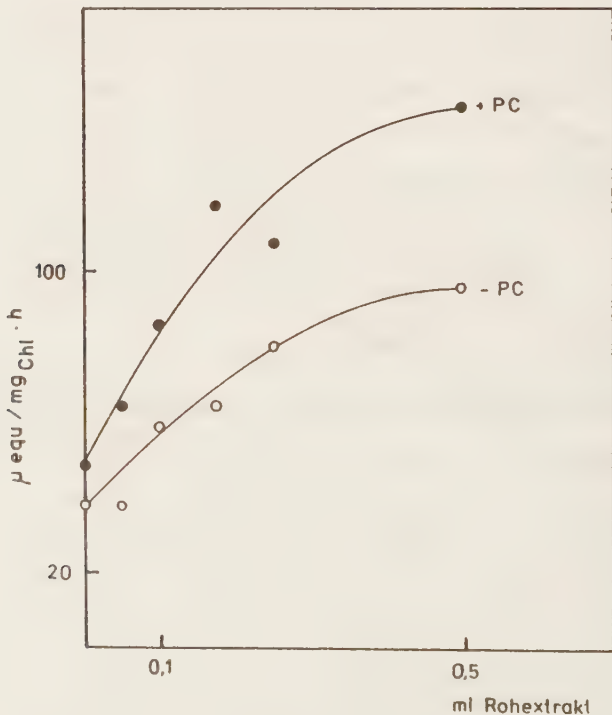
Tabelle 10: Die Photooxidation von NADH in verschieden behandelten Chlamydomonaspartikel

Behandlung	Pellet nach Zentrifugation bei g	Zugabe von PC 1 μ M	Elektronentransport NADH MV Asc/DAD MV μ Mole O ₂ / mg Chl • h			
Kontrolle		-	51		213	
Ultraschall		-	62		276	
20 sec		+	52		276	
1 mg Chl / ml						
Ultraschall	20000	-	57		224	
60 sec		+	73		284	
1 mg Chl / ml	180000	-	40		119	
		+	103		358	
Ultraschall	20000 -	-	1		182	
60 sec	200000	+			257	
50 ug Chl/ ml						
Digitonin	20000	-	0		90	
0.5 %		+	37		338	
30 min	200000	-	0		111	
		+	35		433	
Digitonin	20000 -	-	14		28	
1 %	200000	+	24		325	
30 min						

Zur Messung siehe Abb. 12, zur Ultraschall- u. Digitoninbehandlung den methodischen Teil

al., 1975). Um solche photosensibilisierten Reaktionen auszuschließen, wurde nur mit den Ultraschallpartikeln, UP - 200 genannt, weitergearbeitet, aber nicht mit den Digitoninpartikeln, die möglicherweise schon gelöstes Chlorophyll enthalten.

Abbildung 14: Rekonstitution der NADH - Photooxidation mit Chlamydomonas UP - 200 Partikeln und einem Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln



Zur Meßmethode u. zum Reaktionsansatz siehe Abb. 12. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 4 n Mole PC, Acetonextrakt mit 800 μg Protein / ml bei 54 μg Chl.

Wie in Abbildung 14 dargestellt ist, konnten in diesen UP - 200 Partikeln mit einem Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln die NADH - Photooxidation wieder rekonstituiert werden. Zugabe von Plastocyanin ergab eine nochmalige Stimulierung. Mit erhitztem Acetonextrakt konnten UP - 200 Partikel nicht stimuliert werden. Daher wurde angenommen, daß der Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln eine hitzelabile Komponente enthielt, die die Elektronen von NADH auf die Elektronentransportkette übertrug.

Der Acetonextrakt wurde durch Ausfällen der Chlamydomonaspartikel in der zehnfachen Menge Aceton und durch anschließende Extraktion des Acetonpulver durch 20 mM Tricin / NaOH pH 7.6 und 10 mM KCl erhalten. Nach Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile zeigte er eine gelbe Farbe.

Auch Ultraschallpartikel aus Spinatchloroplasten, die in gleicher Weise wie die UP - 200 Partikel aus Chlamydomonas isoliert wurden, konnten wie Tabelle 11 zeigt, bei Zugabe des Acetonextraktes aus Chlamydomonaspartikeln, NADH im Licht oxidieren. Dies war ohne Zusatz des Acetonextraktes auch bei Zugabe von Plastocyanin nicht möglich.

Ein Acetonextrakt aus Spinatchloroplasten konnte, wie in Tabelle 12 dargestellt ist, die NADH - Photooxidation in UP - 200 Partikeln aus Chlamydomonas in wesentlich geringerem Maße stimulieren als der Aceton-

Tabelle 11: Stimulierung der NADH - Photooxidation in UP - 200 Partikeln aus Chlamydomonaspartikeln und Spinatchloroplasten durch einen Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln

Zugabe zum Reaktions- ansatz	Elektronentransport	
	nMole O_2 / min	μ Mole O_2 / mg Chl. h
UP - 200 Chlam.	19.8	20.5
+ PC	34.7	35.9
UP - 200 Chlam.		
+ 0.5 ml Acetonex.	59.5	61.6
+ PC	59.5	61.6
UP - 200 Spin.	0	0
+ PC	0	0
UP - 200 Spin.		
+ 0.5 ml Acetonex.	24.8	14.9
+ PC	54.5	32.7

Gemessen wurde die lichtabhängige O_2 - Aufnahme in der O_2 - Elektrode. Zum Reaktionsansatz siehe Abbildung 12, er enthielt 58 μ g UP - 200 Chlam. und 100 μ g UP - 200 Spinat.

extrakt aus Chlamydomonas. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Acetonextrakt eine Komponente enthält, die für die NADH - Photooxidation in Ultraschallpartikeln

Tabelle 12: Vergleich der Acetonextrakte aus Spinat-chloroplasten und Chlamydomonaspartikeln in der Stimulierung der NADH - Photooxidation in UP - 200 Partikeln

Zugabe zum Reaktions- medium	Elektronentransport	
	nMole O ₂ / min	µMole O ₂ / mg Chl · h
-	24.3	10.4
+ PC	29.2	12.5
+ 0.5 ml Spinatex.	29.2	12.5
+ PC	34.0	14.6
+ 0.5 ml Chlam.ex.	82.6	44.3
+ PC	102.6	54.7

Gemessen wurde die O₂ - Aufnahme in der O₂ - Elektrode. Zum Reaktionsansatz siehe Abbildung 12. Die beiden ersten Proben enthalten 140 µg Chl, die letzte 112 ug. Der Spinatextrakt enthielt 155 µg Protein / 0.5 ml, der Chlamydomonasextrakt 400 µg Protein / 0.5 ml.

unabhängig von der Quelle der photosynthetischen Membran ist.

Weitere Aktivitäten des Acetonextraktes aus Chlamydomonaspartikel, wie die Oxidation von Succinat mit Ultraschallpartikeln, konnten nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich von NADH, Bernsteinsäure und Ascorbat / DAD als Donatoren für Photosystem I in UP - 200 Partikeln aus Chlamydomonas rekonstituiert mit Acetonextrakt aus Chlamydomonas

Zugabe zum Reaktions-	Elektronentransport	
ansatz	- PC	+ PC
	μ Mole O_2 / mg Chl $\cdot$ h	
+ NADH		
- Acetonextrakt	0	24.0
+ Acetonextrakt	38.1	52.4
+ Bernsteinsäure		
- Acetonextrakt	0	0
+ Acetonextrakt	0	0
+ Ascorbat / DAD		
+ Acetonextrakt	309.8	429.0

Gemessen wurde die O_2 - Aufnahme in der O_2 - Elektrode. Der Reaktionsansatz enthielt 30 mM Hepes / NaOH pH 7.0, 3 mM $MgCl_2$, 0.1 mM MV, 0.5 mM NaN_3 , 30 μ M DCMU, 0.8 μ M PC, 500 μ l Acetonextrakt mit 378 μ g Protein u. 70 μ g Chl.

Um zu entscheiden, ob der Elektronentransport mit NADH als Donor auch in den rekonstituierten UP - 200 partikeln wie in Chlamydomonaspartikeln über Plasto-chinon läuft, wurden Hemmstoffversuche durchgeführt.

Tabelle 14: Wirkung von DNP - INT, Amytal, Rotenon und HgCl_2 auf den photosynthetischen Elektronentransport mit NADH als Donor in rekonstituierten UP - 200 Partikeln

Hemmstoff	Konzentration M	Elektronentransport	
		- Hemmstoff	+ Hemmstoff
		$\mu \text{ Mole O}_2 / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$	
DNP - INT	$2 \cdot 10^{-6}$	45.8	45.8
	$10 \cdot 10^{-6}$	45.8	45.8
Amytal	$3 \cdot 10^{-3}$	45.8	45.8
Rotenon	$5 \cdot 10^{-6}$	45.8	45.8
HgCl_2	$1.5 \cdot 10^{-3}$	61.6	12.8

Gemessen wurde die O_2 - Aufnahme in der O_2 - Elektrode. Zum Reaktionsansatz siehe Abbildung 13. Er enthielt $100 \mu\text{g Chl}$ und $0.5 \text{ ml Acetonextrakt}$ mit $378 \mu\text{g Protein}$.

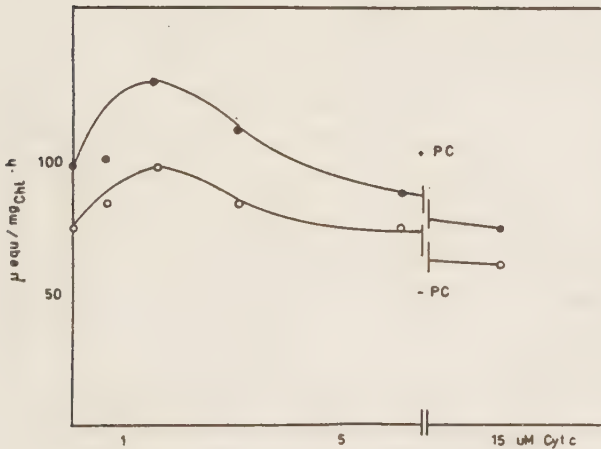
Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Photooxidation von NADH ließ sich nicht mehr mit DNP - INT hemmen. Plastochinon war also nicht mehr am Elektronentransport zwischen NADH und Photosystem I beteiligt. Die NADH - Oxidation mußte über einen anderen Redoxcarrier erfolgen. Die Hemmung der Photooxidation von NADH durch HgCl_2 , das Plastocyanin inhibiert, legte nahe, daß NADH über extern zugegebenes Plastocyanin seine Elektronen an Photosystem I abgibt. Eine photo-

sensibilisierte Oxidation von NADH durch freies Chlorophyll konnte wegen der Hemmbarkeit der Reaktion ausgeschlossen (Krasnovsky, 1979). Rotenon und Amytal hemmten die NADH - Photooxidation in rekonstituierten Ultraschallpartikeln nicht.

Eine Beteiligung von Plastocyanin an der Photooxidation von NADH in rekonstituierten Ultraschallpartikeln wurde durch die Stimulierung der Reaktion durch geringe Mengen Cytochrom c unterstützt (siehe Abbildung 15). Wahrscheinlich reduzierte der Acetonextrakt Cytochrom c mit NADH schneller als Plastocyanin. Cytochrom c, das seinerseits kein Donor für Photosystem I ist, gab seine Reduktionsäquivalente an Plastocyanin, dem Donor für Photosystem I, ab.

Die von dem Acetonextrakt katalysierte Cytochrom c - Reduktion mit NADH konnte auch direkt gemessen werden. Abbildung 16 und 17 zeigen die Abhängigkeit der Cytochrom c - Reduktion von der NADH - bzw. Cytochrom c - Konzentration. Eine Sättigung mit Cytochrom c trat bei 0.2 mM ein. Mit NADH war die Reaktion bei 0.05 mM gesättigt. Ein Vergleich des Acetonextraktes aus Chlamydomonaspartikeln mit einem Acetonextrakt aus Spinatchloroplasten in der Cytochrom c - Reduktion ist in Abbildung 17 dargestellt. Nicht nur der Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln, auch der Acetonextrakt aus Spinatchloroplasten katalysiert die Cytochrom c - Reduktion mit NADH. Doch war der Umsatz

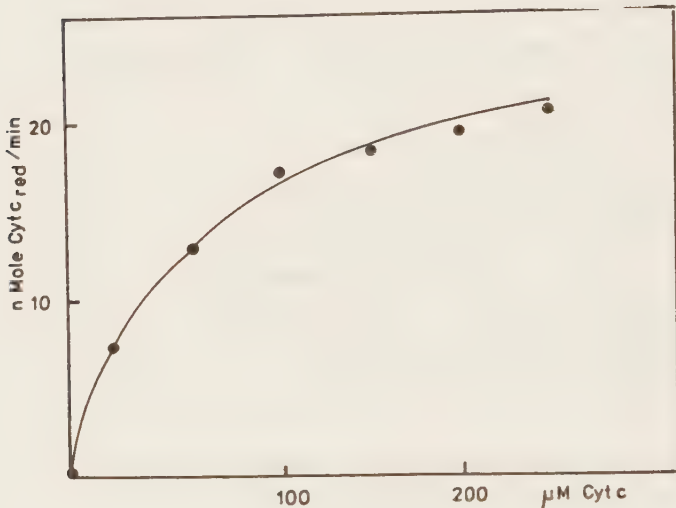
Abbildung 15: Wirkung von Cytochrom c auf die NADH - Photooxidation im rekonstituierten System mit UP - 200 Partikeln und Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln



Gemessen wurde die O_2 - Entwicklung in der O_2 - Elektrode. Zum Reaktionsansatz siehe Tabelle 13. Er enthielt 60 µg Chl und 500 µl Acetonextrakt mit 378 µg Protein.

bedeutend geringer, und auch die K_m - Werte für den Spinatextrakt und den Chlamydomonasextrakt unterschieden sich beträchtlich. Für den Acetonextrakt aus Chlamydomonas wurde ein K_m - Wert für NADH von $1.8 \cdot 10^{-6}$ M ermittelt, für den Spinatextrakt ein K_m - Wert von $1.3 \cdot 10^{-4}$ M. Der Acetonextrakt aus Spi-

Abbildung 16: Abhängigkeit der Cytochrom c - Reduktion mit dem Acetonextrakt aus Chlamydomonas von der Cytochrom c - Konzentration

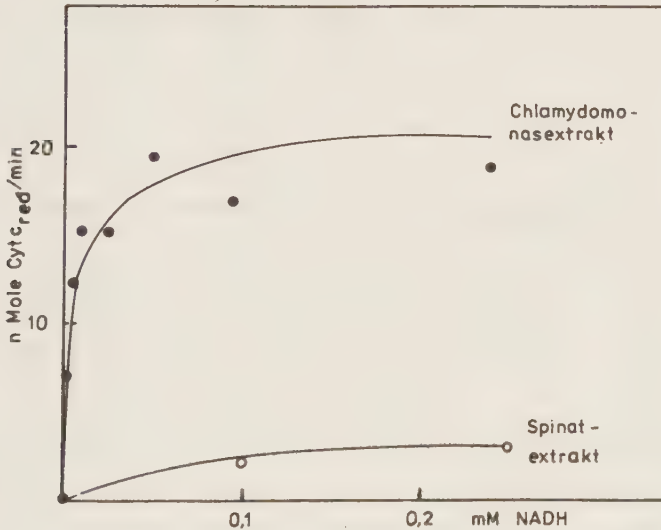


Gemessen wurde die Cytochrom c - Reduktion als Extinktionsänderung bei 550 nm im Aminco in der split - beam - mode gegen H_2O . Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM Hepes / NaOH pH 7.0, 0.5 mM NADH, 50 μ l Acetonextrakt auf 2 ml.

natchloroplasten war also nicht in dem Maße wie der Chlamydomonasextrakt in der Lage, NADH zu oxidieren.

Außer der Cytochrom c - Reduktion katalysierte der Acetonextrakt mit NADH als Substrat auch die Reduktion von DCPIP, FeCy und PMS. Diese Diaphoraseaktivitäten

Abbildung 17: Abhängigkeit der Cytochrom c - Reduktion mit einem Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln oder Spinatchloroplasten von der NADH - Konzentration



Gemessen wurde die Cytochrom c - Reduktion wie in Abbildung 16 angegeben. Der Reaktionsansatz enthielt 0,2 mM Cyt c u. 20 μ l Acetonextrakt.

sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Reduktion von Cytochrom c und DCPIP wurde nicht nur mit NADH, sondern auch mit NADPH als Substrat gemessen. Eine Aktivität des Acetonextrakts mit Succinat wurde nicht festgestellt. Die Anwesenheit einer Succinatdehydrogenase ist deshalb auszuschließen (King , 1967).

Tabelle 15: Reinigung eines Proteins, das die NADH - Oxidation an die photosynthetische Membran von Chlamydomonas koppelt

	n equ / min • mg Protein				
	Roh-	Ultra-	Chromatographie		Anreicher-
	ex-	filtra-	Sepha-	DE-52	ung
	trakt	tion	cryl		
			S-300		
NADH → MV					
UP - 200 Chlam.	14	18	24	240	17
+ PC					
Weitere					
Aktivitäten					
NADH → Cyt. c					
- Flavin	50.4	73.9	85.4	859	17
+ Flavin	91.7	127.3	199.2	1254	13.7
NADH → DCPIP	80.6	112.3	91.6	768	9.5
NADH → O ₂	0	0	0	0	
NADH → FeCy	191.7	106.4	0	0	
NADH → PMS	3147	5767	8360	39633	12.6
Succ. → PMS	0	0			
NADPH → Cyt c	918.2	65.7	27.8		
NADPH → DCPIP	232	96.2	91.6	0	

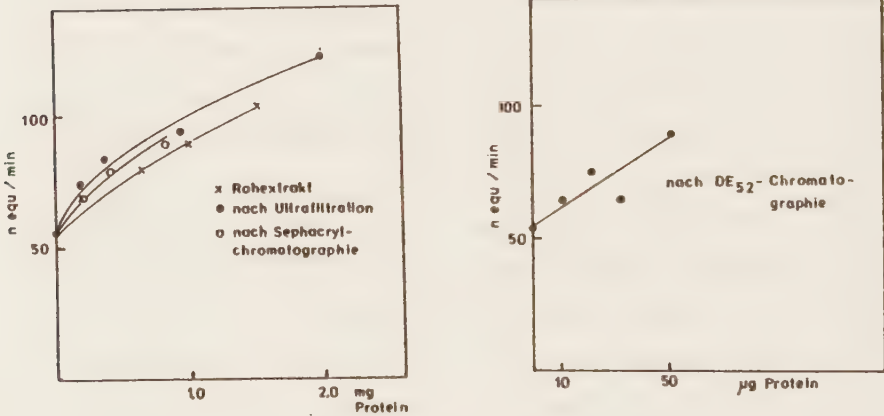
Der Elektronentransport von NADH zu MV wurde als O₂ - Aufnahme gemessen, Cyt c - Reduktion bei 550 nm, Reduktion von DCPIP bei 600, NADH - Oxidation mit 1 mM FeCy oder 0,5 mM PMS, Succ. (2 mM) zu PMS als O₂ - Aufnahme gemessen. Methoden siehe Abb. 16

Amytal und Rotenon hatten keinen Effekt auf die Diaphoraseaktivität des Acetonextraktes mit Cytochrom c. Stimulierende Faktoren waren FMN und FAD bei einer Konzentration von 5 μM .

Um weitere Informationen über die Eigenschaften des Proteins zu erhalten, das die NADH - Oxidation an die photosynthetische Membran koppelt, zu gewinnen, wurde der Acetonextrakt weiter gereinigt. Die Reinigung, die in Tabelle 15 dargestellt ist, umfaßte eine Ultrafiltration zur Abtrennung kleinerer Proteine, eine Gel-filtration mit Sephacryl S-300 und eine anschließende Ionenaustauscherchromatographie mit DE-52. Während der Reinigung wurde die Aktivität, die die NADH - Photooxidation in den UP - 200 Partikeln rekonstituierte, um den Faktor 17, von einer Stimulation der NADH - Photooxidation mit dem Rohextrakt von 28 $\mu\text{equ} / \text{min} \cdot \text{mg}$ Protein auf 480 $\mu\text{equ} / \text{min} \cdot \text{mg}$ Protein nach der DE-52 Chromatographie, angereichert (siehe Abbildung 18).

Parallel dazu wurde auch die Cytochrom c - Reduktion mit NADH als Substrat um den Faktor 17 angereichert. In Anwesenheit von FMN und FAD, die beide die Cytochrom c - Reduktion stimulierten, wurde nur eine 14-fache Anreicherung beobachtet. In der gleichen Größenordnung wurden auch die NADH - abhängigen Diaphoraseaktivitäten mit DCPIP und PMS angereichert. Nur die Aktivität mit FeCy als Akzeptor ging während der

Abbildung 18: Simulation der NADH - Photooxidation mit UP - 200 Partikeln und dem Enzymextrakt nach den verschiedenen Reinigungsschritten

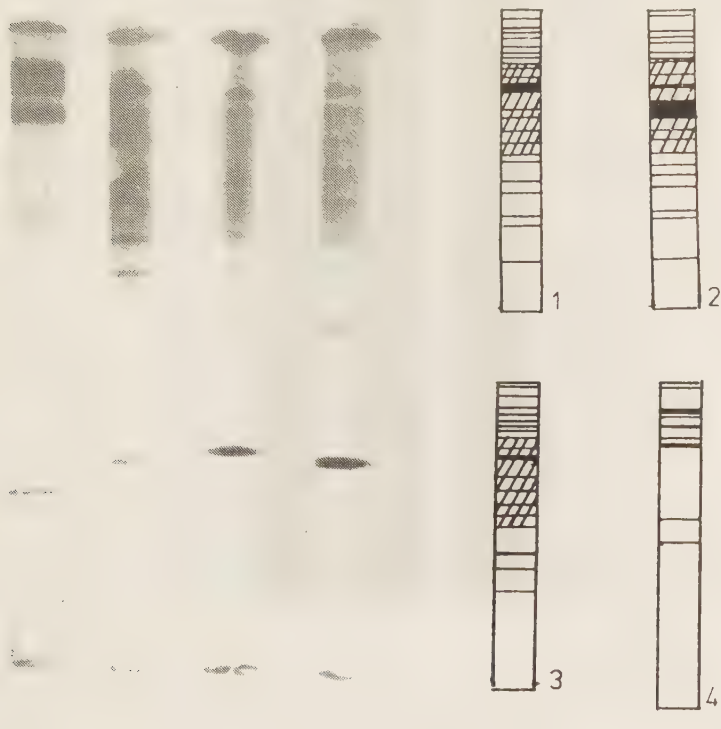


Gemessen wurde die O_2 - Aufnahme. Zum Reaktionsansatz siehe Tabelle 13. Er enthielt 100 μg Chl.

Reinigung verloren. Die NADPH - abhängigen Aktivitäten,, die deutlich abgereichert wurden, schienen nicht spezifisch für das Protein zu sein, das sie NADH - Oxidation an die photosynthetische Membran koppelt.

Nach der DE-52 Chromatographie, die den größten Reinigungsschritt darstellte, waren noch 8 Proteinbanden nach der Discelektrophorese unter nativen Be-

Fotographien a und b: Auftrennung der Proteinen nach den verschiedenen Reinigungsschritten durch Polyacrylamid - Disc - Gelelektrophorese



Die Photographien a und b zeigen die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach den verschiedenen Reinigungsstufen (1 = Rohextrakt, 2 = Ultrafiltration, 3 = Sephacryl S-300, 4 = DE-52) und die dazugehörigen Zeichnungen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie blue gefärbt (siehe Fotografie a).

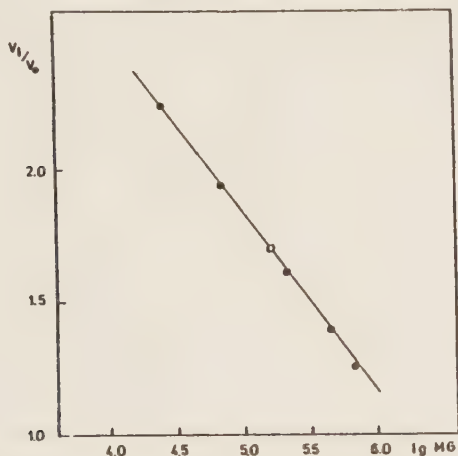
Für die Fotografie danke ich Herrn Vinking



Fotographie b

Fotographie b zeigt die Banden mit DCPIP - Diaphoraseaktivität. Die Gele wurden zuvor mit DCPIP angefärbt, und dann in eine NADH - haltige Lösung gegeben. Die Fotografien wurden nach 1 h Verweildauer in der NADH - Lösung aufgenommen (siehe Methoden). Es sind nur die Gele des Rohextraktes, nach der Gelchromatographie und nach der DE-52 Chromatographie abgebildet. Für die Fotografie danke ich Herrn T. Godde.

Abbildung 19 : Eichung der Sephacryl S-300 Säule zur Molekulargewichtsbestimmung der NADH - Dehydrogenase aus Chlamydomonaspartikeln



Zur Eichung der Sephacryl S-300 Säule siehe in den methodischen Teil. $\circ$ = NADH - Dehydrogenase aus Chlam.

Bedingungen zu erkennen, die in den Photographien und in den dazugehörigen Zeichnungen dargestellt sind. Von diesen 8 Proteinbanden zeigten noch mindestens 3 Diaphoraseaktivität mit DCPIP und NADH. Der Acetonextrakt enthielt nach der nativen Gelelektrophorese dagegen 6 Banden mit Diaphoraseaktivität und eine nicht mehr genau bestimmbare Anzahl von Proteinbanden.

Erste Anhaltspunkte für das Molekulargewicht des Enzyms ergaben sich aus dem Elutionsprofil der Gelchromatographie. Aus der Eichung der Sephacryl S-300

Säule mit Ferretin, Katalase, Aldolase und Rinderserumalbumin ergab sich ein ungefähres Molekulargewicht von 16000 für die NADH - Dehydrogenase aus den photosynthetischen Membranen von *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15.

Diskussion

Nach einer gewissen Adaptionszeit unter anaeroben Bedingungen können eukaryotische einzellige Algen im Licht H_2 entwickeln (Gaffron u. Rubin, 1942). Eine lichtabhängige H_2 - Entwicklung wird sonst nur noch bei photosynthetischen Bakterien (Gest u. Kamen, 1949; Hillmer u. Gest, 1977) und bei Cyanobakterien (Benemann u. Weare, 1974; Bothe et al., 1977; Spiller et al., 1978; Tel - Or et al., 1978) beobachtet. Sie beruht dort auf der Aktivität der Nitrogenase (Yoch, 1978; Bothe u. Eisbrenner, 1978), während sie in Algen von der Hydrogenase katalysiert wird (Kessler, 1974; 1978).

Die zur lichtabhängigen H_2 - Entwicklung in eukaryotischen Algen notwendigen Reduktionsäquivalente können aus zwei Quellen stammen, entweder aus der photosynthetischen Wasserspaltung (Spruit, 1954 ; 1958; Bishop u. Jones, 1976; Bishop et al., 1977; McBride et al., 1978; Krasna, 1977; 1978) oder aus dem Kohlenhydratstoffwechsel (Kaltwasser et al., 1969; Stuart, 1971; Stuart u. Kaltwasser, 1970; Stuart u. Gaffron, 1971; 1972; Healey, 1970 a; b; Frenkel, 1952). Die aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammenden Reduktionsäquivalente werden vor Photosystem I in die photosynthetische Elektronentransportkette eingespeist (Healey, 1970 a; b; Stuart u. Gaffron, 1972;

Stuart u. Kaltwasser, 1971; Stuart, 1971).

Der Donor, über den die Reduktionsäquivalente aus dem Kohlenhydratstoffwechsel an die photosynthetische Elektronentransportkette abgegeben werden, konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Doch machen die bisher veröffentlichten Ergebnisse eine Beteiligung von NADH an der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung wahrscheinlich (Abeles, 1964; Ben - Amotz u. Gibbs, 1975; King et al., 1977 a; b).

Ziel der eigenen Arbeit war es zunächst, diesen endogenen Donor für die Photoproduktion von H_2 zu identifizieren. Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels sind bisher nur bei photosynthetischen Bakterien (Knaff, 1978) bekannt. Weiterhin sollte geklärt werden, welcher Redoxcarrier der photosynthetischen Elektronentransportkette von dem endogenen Donor reduziert wird. Damit stellte sich auch die Frage nach der Zugänglichkeit einer membrangebundenen Elektronentransportkomponente für eine vermutlich hydrophile Substanz.

Die Möglichkeit zur Identifizierung des endogenen Donors bot ein zellfreies System aus Chloroplasten einer Alge, die zur Photoproduktion von H_2 befähigt ist, und einer an die Chloroplasten gekoppelten Hydrogenase. In diesem einfachen System wurden Donatoren eingesetzt, die zur Identifikation des endogenen Donors führten.

Für ein solches zellfreies System war zunächst die Isolation von photosynthetisch aktiven Membranen

notwendig. Bisher sind nur wenige Präparationen von Algenchloroplasten beschrieben, die sowohl Elektronentransport als auch eine gekoppelte Photophosphorylierung aufweisen (Böger, 1969; Böhme et al., 1978; Yannai et al., 1976; Curtis et al., 1975; Brand et al., 1975). Die bisher angewandten Methoden zum Aufbrechen der Algenzellen sind recht hart und werden teilweise, wie die Ultraschallbehandlung, zur Präparation von Subchloroplasten verwandt. Sie können zur Inaktivierung des Elektronentransports und der Photophosphorylierung in den isolierten Thylakoidmembranen führen (Sane u. Hauska, 1972; Hall, 1976; Jacobi, 1977). Deshalb wurde als Untersuchungsobjekt die zellwandlose Mutante *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 gewählt, die im Licht in Gegenwart von DCMU H_2 entwickeln kann.

Es wurde erwartet, daß sie sich zur Isolation von photosynthetischen Membransystemen besser eignet als Algen mit einer rigiden Zellwand. Tatsächlich konnten die Zellen dieser Mutante leicht durch einen Wechsel von einem hyper- in ein hypotonisches Medium (osmotischer Schock) aufgebrochen werden. Die durch Zentrifugation vom Cytoplasma abgetrennten Thylakoidmembranen reduzierten im Licht hydrophile Hill - Akzeptoren wie FeCy, MV und bei Zugabe von Ferredoxin auch Cytochrom c. CO_2 wurde nicht mehr von ihnen fixiert. Der photosynthetische Elektronentransport war in *Chlamydomonas* par-

tikeln an die Bildung von ATP gekoppelt. Das ATP / $2e^-$ - Verhältnis betrug 1.1. Es lag damit im Rahmen der bisher veröffentlichten ATP / $2e^-$ - Verhältnisse für Chloroplasten aus Algen (Böhme et al., 1978; Yannai et al., 1976) und höheren Pflanzen (siehe Hall, 1976).

Die so isolierten Chlamydomonaspartikel konnten an eine Hydrogenase gekoppelt werden und im Licht H_2 entwickeln. Als Hydrogenase wurde nicht die Hydrogenase von Chlamydomonas reinhardi benutzt, deren Anreicherung erst kürzlich beschrieben worden ist (Erbes et al., 1979). Sondern es wurde eine angereicherte Hydrogenasepräparation aus Clostridium pasteurianum benutzt, deren Ankopplung an das photosynthetische Elektronentransportsystem schon oft beschrieben ist (Benemann et al., 1973; Rao et al., 1976; 1978 a; b; Fry et al., 1977; Hoffmann et al., 1977; Rao u. Hall, 1979). Die lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit endogenen Donatoren in Algen ist nur von Photosystem I abhängig. Deshalb wurden zunächst nur artificielle Donatoren für eine von Photosystem I abhängige H_2 - Entwicklung untersucht. Als Mediatoren, die die Reduktionsäquivalente auf die Hydrogenase übertragen, konnten Ferredoxin und MV eingesetzt werden. Schon bei der Untersuchung der anaeroben Photoreduktion von MV mit einem artifiziellen Donorsystem konnte festgestellt werden, daß sie nur in Gegenwart von DTE,

das den lipophilen Donor für Photosystem I reduziert hielt, möglich war. Eigene frühere Ergebnisse (Hoffmann et al., 1977) wurden von Krasna (1978) bestätigt, der allerdings noch eine lichtabhängige Reduktion von MV mit Dithiothreitol, Na_2S und Thioglycolsäure beobachten konnte. Ascorbat, das üblicherweise als Reduktionsmittel für den lipophilen Donor von Photosystem I eingesetzt wird, führte nur zu einem zyklischen Elektronentransport um Photosystem I, aber nicht zu einer Reduktion von MV. Erst die Zugabe von DTE machte eine Reduktion von MV möglich. Auch die lichtabhängige H_2 - Entwicklung wurde nur in Gegenwart von DTE beobachtet. Sie betrug ungefähr $30 \mu \text{ Mole H}_2 / \text{mg Chl} \cdot \text{h}$. Die im Vergleich zu üblichen Elektronentransportraten niedrigen Raten in der H_2 - Entwicklung ließen sich nicht auf eine geringe Aktivität der Hydrogenase zurückzuführen. Sie zeigt nämlich mit Dithionit als Reduktionsmittel wesentlich höhere Raten in der H_2 - Entwicklung als im Licht ohne Dithionit (Krasna, 1978). Es ist deshalb zu vermuten, daß der hohe Anteil des zyklischen Elektronentransports die H_2 - Entwicklung hemmt.

Das System bestehend aus Chlamydomonaspartikeln und Clostridienhydrogenase war zur lichtabhängigen H_2 - Entwicklung geeignet. Deshalb konnte nun mit ihm überprüft werden, ob NADH tatsächlich, wie zu vermuten war (Abeles, 1964; Ben - Amotz u. Gibbs, 1975; King et al.,

1977 a; b), der endogene Donor für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung ist. Einen ersten Anhaltspunkt gab die lichtabhängige H_2 - Entwicklung in diesem System in Gegenwart von Cytoplasmamaterial und Fructose-1,6-bisphosphat oder Lactat und NAD. Bei der Oxidation von Fructose-1,6-bisphosphat oder Lactat zu Pyruvat wird NAD zu NADH reduziert, das seine Elektronen an die photosynthetische Elektronentransportkette abgeben könnte. Es war aber auch hier, wie in den bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen (Abeles, 1964; Ben - Amotz u. Gibbs, 1975; King et al., 1977 a; b) eine Metabolisierung von NADH durch das Cytoplasmamaterial möglich. Diese konnte aber ausgeschlossen werden, weil NADH alleine ohne Cytoplasmamaterial die lichtabhängige H_2 - Entwicklung unterhalten konnte. Da die H_2 - Entwicklung mit NADH nur im Licht zu beobachten war, konnte sie nicht auf die Oxidation von NADH durch die Clostridienhydrogenase zurückgeführt werden, deren eigentlicher Elektronendonator Ferredoxin ist. Es war anzunehmen, daß NADH tatsächlich der gesuchte endogene Donor für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung ist.

NADH muß seine Reduktionsäquivalente vor Photosystem I an die photosynthetische Elektronentransportkette abgeben. Es sollte deshalb auch Donor für andere Photosystem I abhängige Reaktionen sein. Tatsächlich konnten mit NADH in Gegenwart von DCMU die MV katalysierte O_2 - Aufnahme und die Ferredoxin - abhängige

Cytochrom c - Reduktion gemessen werden. NADPH konnte NADH in dieser Reaktion nur in geringem Maße ersetzen. Es war daher anzunehmen, daß nur NADH, nicht aber NADPH, spezifischer Donor für Photosystem I in Chlamydomonaspartikeln ist.

Ein Vergleich von NADH mit artifiziellen Donatoren zeigt einen prinzipiellen Unterschied. Die meisten artifiziellen Donatoren für Photosystem I, zu denen Phenylendiamine, Indamine und Indophenole zählen (Hauska et al., 1975; Oettmeier et al., 1974) reduzieren Plastocyanin, das die Elektronen an Photosystem I weitergibt (siehe Hauska, 1977). Plastocyanin wird aber auf der Innenseite der Thylakoidmembran vermutet (Hauska et al., 1971; Trebst, 1974; 1978). Als Donatoren für Photosystem I sind deshalb nur Substanzen geeignet, die die Thylakoidmembran permeieren können (Hauska, 1972, Hauska et al., 1973; Hauska u. Prince, 1974).

NADH ist eine hydrophile Substanz . Es ist daher nicht zu erwarten, daß es Plastocyanin, wie es bei artifiziellen Donatoren der Fall ist, direkt reduzieren kann. Hemmstoffversuche mit DBMIB und DNP - Jodnithymol, die beide als Hemmstoffe von Plastochinon bekannt sind (Trebst et al., 1970; Böhme et al., 1971; Trebst et al., 1978; Izawa, 1977), zeigten, daß NADH über Plastochinon seine Elektronen an die photosynthetische Membran von Chlamydomonas reinhardi abgibt.

Bisher ist nur Tetra - methyl - p - hydrochinon als Elektronendonator für Photosystem I bekannt, der seine Elektronen über Plastochinon einspeist (White et al., 1978; Izawa u. Pan, 1978).

Eine Hemmung der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung im zellfreien System durch DBMIB mit NADH als Donor wurde schon früher beobachtet (Ben - Amotz u. Gibbs, 1975, King et al., 1977 a; b). Es ist daher zu vermuten, daß auch in diesen Systemen NADH der direkte Donor für Photosystem I ist.

Die Beteiligung von Plastochinon an der Photooxidation von NADH erklärt auch die Ergebnisse von Bishop et al. (1977), nach denen Photosystem II defekte Mutanten kein H_2 mehr entwickeln können. Diese Mutanten weisen nämlich auch Störungen des Plastochinonpools auf (Bishop et al., 1977). Daher kann NADH seine Reduktionsäquivalente nicht an die Elektronentransportkette abgeben.

Es sollte nun auf das Problem der Zugänglichkeit des membrangebundenen Plastochinons für das hydrophile NADH eingegangen werden. Die photosynthetischen Membranen von *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 ähneln, indem sie NADH oxidieren können, Mitochondrien. In Mitochondrien reduziert NADH Ubichinon, das dem Plastochinon der photosynthetischen Elektronentransportkette verwandt ist. In Analogie zu Mitochondrien ist es unwahrscheinlich, daß NADH in *Chlamydomonas*partikeln

Plastochinon direkt reduzieren kann. Sollte dies doch der Fall sein, so sollten auch Spinatchloroplasten NADH im Licht oxidieren können. Dies konnte aber nicht festgestellt werden. Gegen eine direkte Reduktion von Plastochinon spricht das Proteinshield, das der Membran oberhalb des Plastochinonpools auf-
liegt (Renger, 1976). Denn es verzögert sogar die Protonenaufnahme bei der Reduktion von Plastochinon (Ausländer u. Junge, 1974). Ein weiteres Argument gegen eine direkte Reduktion von Plastochinon durch NADH ist darin zu sehen, daß Akzeptoren von Photosystem II, die von Plastochinon reduziert werden (Trebst u. Reimer, 1973 a; b) lipophil sein müssen (siehe Hauska, 1977). Daher ist anzunehmen, daß Plastochinon für hydrophile Substanzen wie NADH nicht zugänglich ist. Die Beteiligung einer Komponente, die die Reduktion von Plastochinon durch NADH katalysiert, ist deshalb wahrscheinlich.

Erste Hinweise auf das Vorhandensein einer solchen Komponente gaben Versuche mit Rotenon und Amytal. Beide hemmen die Reduktion von Ubichinon durch NADH in Mitochondrien (Hatefi, 1978), sind aber als Inhibitoren des photosynthetischen Elektronentransports nicht bekannt (siehe Izawa, 1977). Sie hemmten die NADH - Photooxidation in Chlamydomonaspartikeln zu 60 %. Eine vollständige Hemmung der NADH - Oxidation mit diesen beiden Inhibitoren war in Chlamydomonaspar-

tikeln nicht zu erwarten, denn sie hemmen auch die NADH - Oxidation in Mitochondrien nicht vollständig (Slater, 1967).

Um weitere Informationen über die zur NADH - Oxidation notwendigen Komponente zu erhalten, wurde zunächst versucht, die Chlamydomonaspartikel so zu behandeln, daß sie ihre Fähigkeit zur NADH - Photooxidation verlieren. Dies war erst nach intensiver Ultraschallbehandlung oder nach Behandlung mit 1 % Digitonin möglich. Da recht harte Methoden zur Hemmung der NADH - Oxidation notwendig waren, war anzunehmen, daß die Komponente, die die NADH - Oxidation katalysiert, ziemlich fest an die Membran gebunden ist.

Diese Ultraschallpartikel aus Chlamydomonas oder Spinatchloroplasten, die beide zur NADH - Photooxidation nicht befähigt sind, konnten bei Zugabe eines Acetonextraktes aus Chlamydomonaspartikeln wieder NADH im Licht oxidieren. Ein Acetonextrakt aus Spinatchloroplasten, der auf die gleiche Weise gewonnen wurde, war zur Rekonstitution der NADH - Photooxidation in Ultraschallpartikeln nicht geeignet. Es war daher wahrscheinlich, daß nur der Acetonextrakt aus Chlamydomonaspartikeln, die ja nur alleine zur NADH - Photooxidation befähigt waren, die Komponente enthielt, die die NADH - Oxidation katalysierte. Da hitzebehandelter Acetonextrakt die NADH - Photooxidation nicht mehr stimulierte, mußte diese Komponente ein Protein sein.

Diese Proteinkomponente konnte über Ultrafiltration, Gelchromatographie und Ionenaustauscherchromatographie ungefähr 17-fach angereichert werden. Aus der Retentionszeit in der Gelchromatographie ergab sich ein ungefähres Molekulargewicht von 160000.

Die von Galante und Hatefi (1979) gereinigte lösliche NADH - Dehydrogenase aus dem Komplex I der Mitochondrien besitzt ein Molekulargewicht von 69000. Es ist ein Flavoprotein, das zusätzlich noch 6 säurelabile Eisen- und Schwefelatome enthält. Der Gehalt an Flavinen oder an Eisen - Schwefel - Clustern in der NADH - oxidierenden Komponente aus *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 wurde bisher noch nicht untersucht. Die Zugabe von FMN und FAD stimulierte jedoch die katalytische Aktivität der Proteinkomponente.

Es war allerdings wenig wahrscheinlich, daß diese Komponente in Ultraschallpartikel wie in unbehandelten *Chlamydomonas*partikel Plastochinon reduzierte. Dagegen sprach die Unempfindlichkeit der NADH - Photooxidation gegenüber DNP - Jodnitrothymol, Rotenon und Amytal. Vielmehr war anzunehmen, daß die im Acetonextrakt vorhandene Proteinkomponente die von NADH stammenden Elektronen über extern zugegebenes Plastocyanin an die photosynthetische Elektronentransportkette abgab. Die Beteiligung von Plastocyanin ging aus der Empfindlichkeit der NADH - Photooxidation im rekonstituierten System gegenüber HgCl_2 hervor, das

spezifisch Plastocyanin hemmt (Kimimura u. Katoh, 1972; 1973). Cytochrom c, das Plastocyanin direkt reduzieren kann, stimulierte die NADH - Photooxidation in Ultraschallpartikeln.

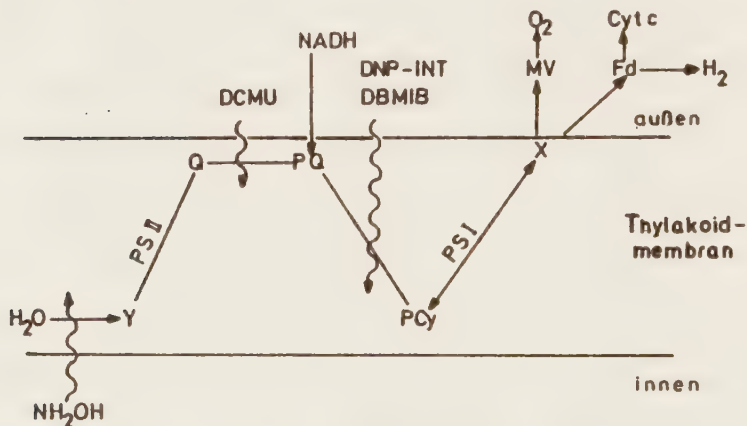
Offensichtlich hatte die Proteinkomponente, die die NADH - Oxidation in Ultraschallpartikeln stimulierte, Diaphoraseeigenschaften. So konnte der Acetonextrakt mit NADH im Dunkeln auch Cytochrom c, DCPIP, FeCy und PMS reduzieren, nicht aber O₂. Bei den durch den Acetonextrakt katalysierten Reaktionen konnte NADPH NADH teilweise ersetzen. Doch ging bei der Reinigung die Fähigkeit zur NADPH - Oxidation verloren. Die angereicherte Proteinkomponente war daher NADH spezifisch. Auch die Fähigkeit zur FeCy - Reduktion ging während der Reinigung verloren. Alle Diaphorasereaktionen waren nicht mehr durch Rotenon oder Amytal hemmbar.

Es ergab sich die Frage, ob das im Acetonextrakt vorhandene Enzym noch mit dem nativen Enzym, das an die Thylakoidmembran von Chlamydomonas reinhardi CW - 15 gebunden ist, identisch war. Denn das isolierte, wasserlösliche Protein war nicht mehr in der Lage, den natürlichen Akzeptor der NADH - Oxidation, Plastochinon, zu reduzieren. Dafür zeigte das isolierte Enzym Diaphoraseeigenschaften, die von dem membrangebundenen Enzym nicht beobachtet wurden. Auch die Hemmeigenschaften hatten sich wesentlich verändert.

Es besteht die Möglichkeit, daß das isolierte Enzym durch die angewandte Isolationsmethode in seinen Eigenschaften verändert wurde. Eine Veränderung der enzymatischen Eigenschaften wird auch bei der Isolation des partikulären Komplexes I und der löslichen NADH - Dehydrogenase aus Mitochondrien beobachtet. Komplex I ist nur dann in der Lage, Ubichinon zu reduzieren, wenn er seine Lipidbestandteile behält (Hatefi, 1978). Werden sie jedoch während der Isolation entfernt, so ist er nur noch zur FeCy - Reduktion fähig (Singer u. Edmondson, 1978). Während die Plastochinon - Reduktion noch Rotenon sensitiv ist, so wird die FeCy - Reduktion nicht mehr von Rotenon gehemmt (Hatefi, 1978; Galante u. Hatefi, 1978; Singer u. Edmondson, 1978; Racker, 1976; Ragan u. Racker, 1973). Auch die lösliche NADH - Dehydrogenase kann Ubichinon nicht mehr reduzieren. Sie zeigt ähnlich wie die Komponente aus den Chlamydomonaspartikeln Diaphoraseaktivität mit einer Reihe von artifiziellen Akzeptoren. Auch sie kann durch Rotenon oder Amytal nicht mehr gehemmt werden (Galante u. Hatefi, 1978; 1979; Singer u. Edmondson, 1978).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der endogene Donor für die Photoevolution von H_2 in Chlamydomonas reinhardi CW - 15, der die Reduktionsäquivalente aus dem Kohlenhydratstoffwechsel an die photosynthetische Membran gibt, mit hoher Wahrscheinlichkeit NADH ist. NADH kann im Licht von isolierten, photosynthe-

tisch aktiven Chlamydomonaspartikeln, oxidiert werden. Diese Oxidation verläuft über Plastochinon und zeigt Ähnlichkeiten mit der mitochondrialen Reduktion Von Ubichinon durch NADH. Der Elektronentransport mit NADH in Chlamydomonaspartikeln läßt sich wie in Schema 3 vereinfachend darstellen.



Schema 3: Elektronentransport in Chlamydomonaspartikeln mit NADH als Elektronendonator

Die bisherigen Versuche lassen vermuten, daß die Thylakoidmembranen von Chlamydomonas reinhardi CW - 15 Eigenschaften haben, die sonst nur mitochondrialen Membranen zugeschrieben werden. Damit ähneln die photosynthetischen Membranen der eukaryotischen Grünalge Chlamydomonas reinhardi CW - 15 den Membranen von photosynthetischen Bakterien und Cyanobakterien, die

noch beide Elektronentransportketten, die respiratorische und die photosynthetische, in einer Membran vereinigt haben (Niederman u. Gibson, 1978; Oelze u. Drews, 1970).

Zusammenfassung

Einzellige Grünalgen, z.B. *Scenedesmus*, *Chlorella* und *Chlamydomonas*, können nach einer Adaptierung an anaerobe Bedingungen im Licht H_2 entwickeln. Die Reduktionsäquivalente zur Photoproduktion von H_2 entstammen entweder der photosynthetischen Wasserspaltung oder dem Kohlenhydratstoffwechsel. Der endogene Donor, der die Reduktionsäquivalente aus dem Kohlenhydratstoffwechsel auf die photosynthetische Membran überträgt, konnte bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Doch war eine Beteiligung von NADH an der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung aus den Versuchen von Gibbs und Mitarbeitern in Boston wahrscheinlich.

In den Versuchen und Ergebnissen dieser Arbeit konnte NADH mit hoher Wahrscheinlichkeit als endogener Donor für die Photosystem I abhängige H_2 - Entwicklung in *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden mit einem zellfreien System erhalten, das aus den photosynthetischen Membranen dieser Mutante und einer angekoppelten Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* bestand.

Da die H_2 - Entwicklung nur eine von vielen Photosystem I - katalysierten Reaktionen darstellt, wurden zur weiteren Charakterisierung der NADH - Photooxidation im zellfreien System die methodisch einfachere MV - katalysierte O_2 -Aufnahme oder die Ferredoxin-

abhängige Cytochrom c - Reduktion in Gegenwart von DCMU untersucht.

Aus Hemmstoffversuchen wurde geschlossen, daß NADH seine Reduktionsäquivalente über das endogene Plastochinon an die photosynthetische Elektronentransportkette abgibt. Erste Hinweise auf eine Komponente, die die Reduktion des membrangebundenen Plastochinons durch das hydrophile NADH ermöglicht, gibt die Hemmung der NADH - Photooxidation durch Rotenon und Amytal. Beide Substanzen sind nicht als Hemmstoffe des photosynthetischen Elektronentransports bekannt. Sie hemmen aber die Reduktion von Ubichinon mit NADH im respiratorischen Elektronentransport der Mitochondrien, die durch eine membrangebundene NADH - Dehydrogenase katalysiert wird. Chloroplasten aus Spinat, der wie alle höheren Pflanzen keinen H_2 - Stoffwechsel besitzt, konnten NADH im Licht nicht reduzieren. Dies unterstützt die physiologische Bedeutung der NADH - Photooxidation für die lichtabhängige H_2 - Entwicklung.

Aus den Chlamydomonaspartikeln konnte durch Acetonbehandlung eine Proteinkomponente isoliert werden, die in Ultraschallpartikeln aus Chlamydomonas aber auch aus Spinat, die kein NADH oxidieren können, die NADH - Photooxidation rekonstituieren. Diese Proteinkomponente wurde durch Ultrafiltration, Gelchromatographie und Ionenaustauscherchromatographie 17 fach angereichert. Außer der Rekonstitution der Ultraschallpartikel

zeigte sie noch eine Reihe von Diaphoraseeigenschaften. Diese Eigenschaften ließen auf eine Flavin - haltige NADH - Dehydrogenase schließen.

Einige Eigenschaften des ursprünglichen Systems sind in dem rekonstituierten System verloren gegangen. So läuft der Elektronentransport von NADH zu Photosystem I nicht mehr über Plastochinon, sondern über extern zugegebenes Plastocyanin. Auch Rotenon und Amytal konnten die NADH - Photooxidation im rekonstituierten System nicht mehr hemmen. Die geänderten Eigenschaften der löslichen NADH - Dehydrogenase aus *Chlamydomonas* könnten auf dem Verlust der lipophilen Komponente des membrangebundenen Enzyms während der Isolierung beruhen, wie er auch bei der Isolation der NADH - Dehydrogenase aus Mitochondrien beobachtet werden kann.

Material und Methoden

Verwendetes Material:

Enzyme und Coenzyme von Boehringer, Mannheim; Methylviologen von Serva, Heidelberg; Ar(spezial), N₂(tech) und H₂(spezial) von Messer Griesheim, Düsseldorf; sonstige Chemokalien von Merck, Darmstadt.

Clostridium pasteurianum (ATCC 6013) von der American Type Cultur Collection, Rockville, Maryland, USA.

Chlamydomonas reinhardi CW - 15 von Herrn Prof. Dr. N. Amrhein, Bochum.

Anzucht von *Chlamydomonas reinhardi* CW - 15:

Nährmedien:

Zur Anzucht von *Chlamydomonas reinhardi* CW - 15 diente das Nährmedium nach Gorman u. Levine (1965) geändert nach Amrhein u. Filner (1973).

Zusammensetzung der Nährmedien: Für 1 l TAP - Medium w wurden 10 ml Beyerinck'sche Lösung, 1 ml Kaliumphosphatpuffer, 1 ml Spurenelemente, 2,42 g Tris und 1.04 ml Eisessig auf 1 H₂O_{bidest} gegeben. Der pH - Wert des TAP - Medium betrug 7.2. Das YAPS - Medium enthielt zusätzlich 0.4 % Difco Yeast Extract, 0.5 % Pepton und 2.0 % Saccharose.

1. Beyerinck'sche Lösung: 8g NH₄Cl, 1 g CaCl₂ · H₂O,

2 g MgSO₄ · 7 H₂O ad 200 ml H₂O_{bidest}

2. Kaliumphosphatpuffer 1 M, pH 7.2

3. Spurenelemente: 50 g EDTA Dinatriumsalz, 22 g

ZnSO₄ · 7 H₂O, 11.4 g HBO₃, 5.06 g MnCl₂ · 4 H₂O, 4.99 g

FeSO₄ · 7 H₂O, 1.61 g CoCl₂ · 6 H₂O, 1.57 g CuSO₄ · 5 H₂O,

1.1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O ad 1000 ml H₂O_{bidest}, pH 6.5 - 6.8.

50 ml - Erhaltungskulturen

250 ml Erlenmeyer Enghalskolben wurden mit 50 ml YAPS - Medium gefüllt und einmal autoklaviert. Das In-

okulum betrug 2 ml einer Erhaltungskultur. Die Algen wurden unter Schütteln auf einer Lichtbank bei 25°C angezogen.

250 ml Kulturen

Die Anzuchtröhren wurden mit 250 ml TAP - Medium gefüllt und einmal autoklaviert. Das Inokulum betrug 25 ml einer Erhaltungskultur. Die Anzuchtröhren wurden bei 35000 Lux in einem Lichtthermostaten bei 25°C beleuchtet. Sie wurden ständig mit einem Luft / CO₂ - Gemisch, das 5 % CO₂ enthielt, begast.

10 l - Kulturen

Eine große Glasflasche, die 9.5 l TAP - Medium enthielt, wurde zweimal in einem Abstand von 12 h autoklaviert. Das Inokulum betrug 500 ml (2 Anzuchtröhren). Die Algen wurden im Dauerlicht bei stetigem Begasen mit obigem Luft / CO₂ - Gemisch angezogen. Chlamydomonas reinhardi erhielt ich dankeswerterweise von Herrn Prof. Dr. N. Amrhein.

Anzucht von Clostridium pasteurianum

Nährmedium:

Zur Anzucht von Clostridium pasteurianum diente ein Vollmedium mit Glucose als Energiequelle unter Zusatz von Hefeextrakt und Pepton (Lovenberg et al., 1963).

Lösung 1: 20 g Glucose, wasserfrei, 1 mg Biotin, 1 g p-Amino-benzoesäure, 100 mg NaCl, 1 g NH₄Cl, 200 mg MgSO₄ · 3 H₂O, 10 mg Na₂MoO₄ · 2 H₂O ad 200 ml H₂O bidest.

Lösung 2: 20.5 g K₂HPO₄ · 3 H₂O, 1.4 g KH₂PO₄ ad 100 ml H₂O bidest.

Lösung 3: 50 mg FeSO₄ · 7 H₂O, 1 N HCL ad 5 ml.

Lösung 4: 5 g Hefeextrakt (Difco), 5 g Pepton ad 200 ml H₂O bidest.

Die Lösungen 1 - 4 wurden getrennt autoklaviert und nach dem Erkalten auf 50°C gemischt und auf 1 l mit autoklaviertem H₂O bidest aufgefüllt.

Kulturerhaltung:

Zur Kulturerhaltung wurde *Clostridium pasteurianum* auf einem Minimalmedium gezogen, das sich vom Vollmedium durch das Fehlen von Hefeextrakt und Pepton unterschied. Ein Kulturröhrchen mit 6 ml Minimalmedium wurde mit 0.5 ml einer alten Erhaltungskultur angeimpft.

Großzüchtung:

Zur Erhaltung großer Mengen von *Clostridium pasteurianum* wurde der Organismus in einem 50 l Plastiktank auf Vollmedium gezogen. Ausgehend von 4 Erhaltungskulturen wurde in 2 Schritten, über eine 100 ml und eine 1 l Kultur, eine 10 l Kultur erhalten, die als Inokulum für die 50 l Kultur diente.

Herstellung anaerober Anzuchtbedingungen:

Clostridium pasteurianum kann als obligat anaerober Organismus nur unter streng anaeroben Bedingungen angezogen werden. Die Kulturerhaltungsröhrchen wurden wie folgt anaerobisiert. Das noch warme Medium wurde zu 6 ml in schon sterilisierte Reagenzgläser gefüllt. In jedes Reagenzglas kam ein Wattestopfen, und darüber in einem Abstand von 1 cm ein Mullröllchen, das mit 1 ml einer gesättigten K_2CO_3 - Lösung und 0.3 ml einer 10 % Pyrogallollösung getränkt wurde. Die Reagenzgläser wurden sofort mit einem Gummistopfen verschlossen. Nach 24 h hatten sich erfahrungsgemäß anaerobe Bedingungen eingestellt. Die 100 ml, 1l und 10 l Kulturen wurden durch Begasen mit CO_2 anaerobisiert. Der 50 l Tank wurde weder sterilisiert noch anaerobisiert.

Alle Kulturen, außer der 50 l Kultur, wurden bei $37^{\circ}C$ agezogen.

Clostridium pasteurianum erhielt ich freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Thauer.

Herstellung eines Rohextraktes aus Clostridium pasteurianum

10 g eingefrorener Zellen von Clostridium pasteurianum wurden mit 20 mg Lysozym und 5 mg DNase versetzt und in anaeroben H_2O bidest unter abwechselndem Begasen mit H_2 und Evakuieren mit der Wasserstrahlpumpe suspendiert. Danach wurde die Zellsuspension 30 min unter H_2 bei $35^\circ C$ inkubiert. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 20000 g entfernt.

Der Überstand, der sowohl Hydrogenase - wie auch Pyruvat - Ferredoxin - Oxidoreduktaseaktivität enthielt, konnte ohne merklichen Aktivitätsverlust bei $-20^\circ C$ aufbewahrt werden. Der Proteingehalt betrug durchschnittlich 20 mg / ml.

Reinigung des Rohextraktes aus Clostridium pasteurianum

Zur Entfernung der Pyruvat - Ferredoxin - Oxidoreduktase wurden nach Zähringer (1973) und van Lin (1977) 10 ml des Clostridienrohextraktes mit 1 N CH_3COOH unter N_2 in einer Glovebox auf pH 5.5 eingestellt und anschließend mit H_2 begast. Das Homogenat wurde 30 min bei $60^\circ C$ inkubiert. Ausgefallene Proteine wurden durch 30 min Zentrifugation bei 20000 g entfernt. Der Überstand, der noch 50 bis 70 % der Hydrogenaseaktivität besaß, aber keine Pyruvat - Ferredoxin - Oxidoreduktaseaktivität mehr aufwies, wurde mit 2 N NaOH auf pH 6.5 eingestellt. Ferredoxin wurde bei dieser Reinigung nicht entfernt.

Bestimmung der Hydrogenaseaktivität

Die Hydrogenaseaktivität wurde als enzymabhängige MV - Reduktion mit H_2 bei 600 nm im Zeiss PM Q II bestimmt. Die Reaktion wurde in 3 ml Küvetten durchgeführt, die zuvor durch Begasen mit N_2 und Evakuieren anaerobisiert wurden. Das Reaktionsmedium enthielt in 2 ml 100 mM Tris / Acetat pH 8.8, 8 μl Mercaptoethanol und 5 mM MV. Wenn die Küvetten anaerob waren, stellte sich

ein Gleichgewicht zwischen H_2 und MV ein, sodaß die Küvetten durch das reduzierte MV leicht bläulich schienen. Die Reaktion wurde durch Enzymzugabe gestartet.

Bestimmung der Pyruvat - Ferredoxin - Oxidoreduktase - Aktivität

Die Pyruvat - Ferredoxin - Oxidoreduktaseaktivität wurde als enzymabhängige MV - Reduktion bei 600 nm im Zeiss PM Q II gemessen. Die Reaktion fand in mit Argon anaerobisierten Küvetten statt. Das Reaktionsmedium enthielt in 3 ml 100 mM Tris / Acetat pH 8.8, 8 μ l Mercaptoethanol, 40 mM Pyruvat, 0.1 mM Thiaminpyrophosphat und 0.1 mM Coenzym A. Die Reaktion wurde durch Enzymzugabe gestartet.

Isolation von Spinatchloroplasten

Spinatchloroplasten wurden aus entrippten Spinatblättern nach der Methode von Nelson et al. (1970) als "broken chloroplasts" isoliert.

Isolation von Chlamydomonaspartikeln

250 ml einer Kultur in der späten logarithmischen Phase von *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 mit einer durchschnittlichen Chlorophyllmenge von 5 mg wurden durch 10 min Zentrifugation bei 250 g im Sorvall GSA - Rotor abzentrifugiert. Die abgeernteten Algen wurden mit Lösung A (Alle Lösungen lehnten sich an das Jensen - Bassham - Medium an (Jensen u. Bassham, 1966) an.) gewaschen und bei 2000 g im Sorvall SS - 34 5 min abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit Lösung B hypotonisch aufgebrochen und abzentrifugiert. Der Überstand war gelb - grün und wurde verworfen. Das Pellet, bestehend aus osmotisch geschockten *Chlamydomonas*partikeln, wurde noch zweimal mit Lösung C gewaschen. Lösung O: 50 mM Hepes / NaOH pH 7.0 , 2 mM EDTA Dinatriumsalz, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 0.5 mM K_2HPO_4 , 10 mM NaCl.

Lösung A: Lösung O + 0.35 M Sorbit

Lösung B: Lösung O + 2 % Polyvinylpyrrolidon, 1 mg / ml Natriumascorbat, 2 mg / ml Rinderserumalbumin

Lösung C: Lösung O + 0.35 M Sorbit, 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 mg / ml Rinderserumalbumin

Beschallte Spinatchloroplasten UP - Spinat

Beschallte Spinatchloroplasten wurden in Anlehnung an Böhme et al. (1971) hergestellt. Spinatchloroplasten wurden wie angegeben isoliert. Nach der ersten Zentrifugation wurde das Pellet in 20 mM Tris / HCl pH 7.6 aufgenommen und auf 0.05 mg Chl / ml eingestellt. Die Chloroplasten wurden mit der Mikrospritze des Bronson Sonifiers bei 4 - 4.5 A im Eis 1 min beschallt. Nach dem Beschallen wurde die Suspension auf 50 mM NaCl eingestellt. Die Partikel, die zwischen 40000 g und 200000 g abzentrifugiert wurden, wurden in 0.4 M Saccharose, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris / HCl pH 7.6 resuspendiert und auf 1 mg Chl / ml eingestellt. Die Partikel konnten längere Zeit in flüssigem N_2 aufbewahrt werden.

Beschallte Chlamydomonaspartikel UP - 200

Beschallte Chlamydomonaspartikel wurden in Anlehnung an Böhme et al. (1971) hergestellt. Die Partikel wurden in Lösung B bei 0.05 mg Chl / ml 1 min beschallt. Die Ultraschallpartikel, die zwischen 40000 g und 200000 g abzentrifugiert wurden, wurden in Lösung C aufgenommen und wie beschallte Spinatchloroplasten aufgehoben.

Digitoninbehandlung von Chlamydomonaspartikeln

Chlamydomonaspartikel wurden wie üblich isoliert und in Lösung A aufgenommen. Sie wurden in Anlehnung an Hauska et al. (1970) mit einer 10 % Digitoninlösung auf 0.5 % oder 1 % Digitonin eingestellt und 30 min unter Rühren inkubiert. Die Partikel, die zwischen

20000 g und 250000 g abzentrifugiert wurden, wurden in Lösung A eingefroren und in flüssigem N_2 aufbewahrt.

NH_2OH - behandelte Chlamydomonaspartikel

Chlamydomonaspartikel wurden nach der Methode von Harth et al. (1974) mit NH_2OH behandelt.

$HgCl_2$ - Behandlung der Chlamydomonaspartikel

Die Chlamydomonaspartikel wurden mit der im Ergebnisteil angegebenen $HgCl_2$ - Konzentration nach der Methode von Kimimura u. Kato (1972) behandelt.

Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung bei Spinatchloroplasten und Chlamydomonaspartikeln wurde nach der Methode von Arnon (1949) durchgeführt.

Bestimmung der photosynthetischen Aktivitäten

Bestimmung der Photophosphorylierung

Radioaktives ATP wurde als organisch gebundenes ^{32}P nach der Methode von Conover et al. (1972) bestimmt. .

Bestimmung der FeCy - Reduktion

Gemessen wurde die zeitliche Änderung der Extinktion bei 420 nm im Zeiss PM Q II mit seitlicher Belichtung ($1 \cdot 10^6$ ergs / cm^2 / sec). Die Zusammensetzung des Reaktionsmediums ist bei den gezeigten Versuchen angegeben.

Bestimmung der MV - katalysierten O_2 - Aufnahme

Gemessen wurde die MV - katalysierte O_2 - Aufnahme in einer mit einer Teflonmembran bedeckten O_2 - Elek-

trode nach Delieu u. Walker (1972), die mit Weißlicht (20000 Lux) belichtet wurde. Die Zusammensetzung des Reaktionsmediums ist bei den gezeigten Versuchen angegeben.

Bestimmung der lichtabhängigen MV - Reduktion unter anaeroben Bedingungen

Die Reaktion wurde als Extinktionsänderung bei 600 nm im Zeiss PMQ II mit seitlicher Belichtung ($1 \cdot 10^6$ ergs / cm^2 / sec) gemessen. Sie fand in 3 ml Küvetten statt, die einen Schliff hatten und mit einem weichen Gummistopfen verschlossen waren. Sie wurden anaerobisiert, indem sie 50 mal unter Schütteln mit Argon spezial begast und anschließend an der Wasserstrahlpumpe evakuiert wurden. Genaue Angaben zum Reaktionsmedium finden sich bei den gezeigten Versuchen.

Bestimmung der Cytochrom c - Reduktion

Die Reduktion von Cytochrom c wurde nach Oettmeier u. Lockau (1973) im Zeiss PM Q II mit seitlicher Belichtung ($1 \cdot 10^6$ ergs / cm^2 / sec) verfolgt.

Bestimmung der NADP - Reduktion

Die NADP - Reduktion wurde im Zeiss PM Q II mit seitlicher Belichtung ($1 \cdot 10^6$ ergs / cm^2 / sec) bei 340 nm verfolgt. Das Reaktionsmedium enthielt in 2 ml 100 mM Hepes / NaOH pH 7.0, 10 mM MgCl_2 , 15 μg Gramicidin / ml, 3 mM NADP, 100 μg Ferredoxin, 60 μg Reduktase und 20 μg Chl.

Photoproduktion von H_2 in ganzen Zellen von Chlamydomonas reinhardi CW - 15

Die lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit Chlamydomonas reinhardi CW - 15 wurde manometrisch bei 27°C gemessen. Die Reaktion fand in Warburggefäßen mit einem durchschnittlichen Volumen von 15 ml statt. Das Reaktions-

medium ist bei dem gezeigten Versuch angegeben. Die Algen wurden wie schon beschrieben abgeerntet und noch einmal mit 50 mM Tris / HCl pH 7.3, 10 mM KCl und 5 mM $MgCl_2$ gewaschen. Um den noch im Warburggefäß vorhandenen Sauerstoff und das während der Belichtung freiwerdende CO_2 abzufangen, enthielt der Zentralzylinder 0.3 ml alkalisches Pyrogallol. Dazu wurden 9 g KOH in 30.5 ml H_2O bidest gelöst und 15 min mit Argon spezial begast. Danach wurden 1.5 g Pyrogallol unter stetigem Argonstrom in der KOH - Lösung gelöst. Vor Beginn der Reaktion wurden die Algen im Reaktionsmedium 1 h lang unter Schütteln mit Argon an die anaeroben Bedingungen im Dunkeln adaptiert. Belichtet wurde mit Weißlicht (30000 Lux).

Lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit Chlamydomonaspartikeln und gekoppelter Hydrogenase aus Clostridium pasteurianum

Die lichtabhängige H_2 - Entwicklung mit Chlamydomonaspartikeln wurde manometrisch und gaschromatographisch bestimmt.

Die manometrische Messung wurde in Warburggefäßen mit 2 Kaminen durchgeführt. Das Reaktionsmedium umfaßte 2 ml. Genaue Angaben finden sich bei den gezeigten Versuchen. Die Gefäße wurden mit N_2 techn. begast und dann 2 min vorbelichtet, um eventuell noch vorhandenes O_2 durch die Reaktion mit reduziertem MV zu zerstören. Danach wurde durch die zweite Kaminöffnung, die mit einem Gummistopfen verschlossen war, 50 μ l Clostridienrohextrakt hinzugespritzt. Belichtet wurde mit Weißlicht (30000 Lux).

Zur gaschromatographischen Bestimmung der lichtabhängigen H_2 - Entwicklung wurde die Reaktion in einfachen Glasgefäßen durchgeführt, die ein durchschnittliches Volumen von 5.5 ml hatten und mit einem weichen Gummistopfen verschlossen wurden. Das Reaktionsmedium umfaßte 2 ml. Genaue Angaben seiner Zusammensetzung finden sich bei

den gezeigten Versuchen. Vor der Zugabe der gereinigten Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* wurde der Reaktionsansatz im Dunkeln durch abwechselndes Begasen mit Argon spezial und Evakuieren anaerobisiert. Danach wurden die Gefäße im Wasserbad bei 30000 Lux mit Weißlicht bei 20° C belichtet. Nach Abstoppen der Reaktion mit 0.2 ml 1 N HClO₄, wurden 100 ul der Gasphase in einen Varian Aerograph 920, ausgestattet mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor, eingespritzt. Der Injektor war ungeheizt, die Edelstahlsäule mit einem Innendurchmesser von 2 mm und einer Länge von 210 cm, gefüllt mit Molekularsieb 5 A, hatte eine Temperatur von 35° C. Der Detektor hatte eine Temperatur von 105° C. Der Strom im Filament betrug 115 mA. Die Retentionszeit für H₂ betrug 60 sec.

Isolation von Plastocyanin

Plastocyanin wurde aus 5 kg Marktspinat nach der Methode von Lien u. Bannister (1971) isoliert.

Isolation von Spinatferredoxin

Spinatferredoxin wurde aus 5 kg Marktspinat nach der Methode von Tagawa u. Arnon (1962) isoliert.

Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung diente die Methode von Lowry et al. (1952) Standardprotein war Rinderserumalbumin. Zur schnellen Proteinbestimmung diente die Methode von Warburg u. Christian, 1941.

Herstellung eines Acetonextraktes aus Chlamydomonaspartikeln

10 l einer 48 h alten Kultur von *Chlamydomonas reinhardtii* CW - 15 mit einer Chlorophyllmenge von 150 - 200 mg wurden in einer Christ Durchlaufzentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 5000 Rpm abgeerntet. Die Zellen wurden in 50 mM Tris / HCl pH 7.0, 0.35 M Sorbit ge-

waschen und danach mit demgleichen Puffer ohne Sorbit aufgebrochen. Nach der Zentrifugation wurden die Partikel in 150 ml desgleichen Puffers aufgenommen und in die 10 fache Menge Aceton, das in einer Eis - Kochsalz - Mischung stand, unter Rühren langsam eingetropft. Nachdem sich die Proteine abgesetzt hatten, wurde die Acetonphase abgehebert. Das Acetonpulver wurde abgenutscht und getrocknet. Das trockene Acetonpulver wurde in TK - Puffer bestehend aus 20 mM Tricin / NaOH pH 7.6 und 10 mM KCl aufgenommen und 30 min unter langsamen Rühren homogenisiert. Nicht gelöste Proteine wurden bei 45000 g 15 min abzentrifugiert. Der nun gelbe Überstand wurde gegen 1 / 10 TK - Puffer über Nacht bei einmaligem Wechsel des Puffers dialysiert. Ausgefallene Proteine wurden nochmals unter den genannten Bedingungen abzentrifugiert.

Reinigung der im Acetonextrakt vorhandenen NADH - abhängigen Enzymaktivität

1. Schritt: Ultrafiltration

Niedermolekulare Proteinen wurden durch Ultrafiltration durch eine Amicon XM - 50 Membran abgetrennt. Der Acetonextrakt wurde von 50 ml auf 12 ml eingeeengt.

2. Schritt: Gelchromatographie mit Sephacryl S-300

Die Säule hatte einen Durchmesser von 2.2 cm, ihre Höhe betrug 60 cm. Sie Säule war mit TK - Puffer äquilibriert, der auch als Elutionspuffer diente.

3. Schritt: Ionenaustauscherchromatographie mit DE₅₂

Die Säule hatte einen Durchmesser von 2 cm, ihre Höhe betrug 3 cm. Sie war mit TK - Puffer äquilibriert. Zur Elution wurde ein diskontinuierlicher Gradient von je 20 ml TK - Puffer angelegt, der 10, 20, 50, 75, 100, 250 und 500 mM KCl enthielt. Die Aktivität wurde bei 10 mM KCl eluiert.

Messungen der NADH - abhängigen Diaphoraseaktivität

Die Messungen der NADH - abhängigen Diaphoraseaktivität geschah im Zeiss PM Q II oder im Aminco unter

den bei den Versuchen angegebenen Bedingungen.

Disc - Gelelektrophorese

Die Disc - Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an Davies (1964) und Williams u. Reisfeld (1964) durchgeführt. Zur Herstellung der Gele wurden 3.1 ml H₂O, 7 ml Acrylamidlösung, 17.6 ml Gelpuffer und 20 µl TEMED gemischt und entgast. Danach wurden 0.3 ml Ammoniumpersulfatlösung hinzugegeben.

Gel - Puffer: 48 ml 1 N HCl, 15.9 g Saccharose ad 100 ml mit festem Tris auf pH 7.9 eingestellt.

Acrylamidlösung: 28 g Acrylamid, 0.735 g Bisacrylamid ad 100 ml (Reagenzien von Biorad)

Ammoniumpersulfatlösung: 35 mg / ml Ammoniumpersulfat (Biorad)

Zur Herstellung des stacking - Gels wurden 2 ml stacking - Gel - Puffer, 2 ml Riboflavinlösung, 4 ml Acrylamidlösung und 7,9 ml Saccharoselösung miteinander gemischt und entgast. Die Polymerisation fand unter UV - Licht statt.

stacking - Gel - Puffer: 48 ml 1 N HCl, 0.46 ml TEMED (Biorad), 5.98 g Tris ad 100 ml pH 6.7

Acrylamidlösung: 10 g Acrylamid, 2.5 g Bisacrylamid ad 100 ml

Riboflavinlösung: 4 mg Riboflavin / ml

Saccharoselösung: 40 g Saccharose ad 100 ml

Der Reservoirpuffer im unteren Gefäß bestand aus 7.89 g L-Asparagin, 150 g Saccharose ad 500 ml. Der pH wurde mit festem Tris auf 7.3 eingestellt. Der Reservoirpuffer im oberen Gefäß bestand aus 2.61 g L-Asparagin und 25 g Saccharose ad 500 ml. Der pH - Wert wurde mit festem Tris auf pH 7.3 eingestellt. Zur Durchführung der Disc - Gelelektrophorese wurden Proteinproben von 50 - 100 µg auf die Gele aufgetragen. Zum stacking wurde eine Spannung von 2 mV pro Gelröhrchen angelegt, zur Auftrennung 4 mV pro Gelröhrchen.

Proteinbanden wurden nach der Methode von Blakesly u.

u. Boezi (1977) angefärbt.

Die Anfärbung von Proteinbanden mit NADH spezifischer Enzymaktivität nutzte ihre Diaphoraseaktivität mit DCPIP aus. Die Gele wurden in 50 mM Hepes / NaOH pH 7.0, der 4 mM DCPIP enthielt, 15 min angefärbt. Danach wurden die Gele in denselben Puffer, der 7,2 mM NADH enthielt, gegeben. Nach 1 h waren die Proteinbanden mit NADH spezifischer Enzymaktivität entfärbt.

Eichung der Sephacryl S-300 Säule

Zunächst wurde mit Dextranblau das Ausschlußvolumen bestimmt. Danach wurde auf die mit TK - Puffer äquilibrierte Säule je 1.5 mg Ferretin, Katalase, Aldolase und Rinderserumalumin aufgetragen und das Elutionsvolumen bestimmt.

Literaturverzeichnis

- Abeles, F.B., 1964, Plant Physiol., 39, 169 - 176
- Amrhein, N., Filner, P., 1973, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 70, 1099 - 1103
- Arnon, D.I., 1949, Plant Physio., 12, 1 - 15
- Ausländer, W., Junge, W., 1974, Biochim.Biophys.Acta, 357, 285 - 298
- Ben-Amotz, A., Gibbs, M., 1975, Biochem.Biophys.Res.Com., 64, 355 - 359
- Benemann, J.R., Berenson, J.A., Kaplan, N.O., Kamen, M.D., 1973, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 70, 2317 - 2320
- Benemann, J.R., Weare, N.M., 1974, Science, 184, 174 - 175
- Berzborn, R.J., Bishop, N.I., 1973, Biochim.Bionphys.Acta., 292, 700 - 714
- Bishop, N.I., Frick, M., Jones, L.W., 1977, in: Biological Solar Energy Conversion, Mitsui, A., Miyachi, S., San Pietro, A., Tamura, S., Ed., pp 3 - 32, New York, Acad. Press
- Bishop, N.I., Gaffron, H., 1962, Biochem.Biophys.Res.Com., 6, 471
- Bishop, N.I., Jones, L.W., 1978, in: Current Topics of Bioenergetics, Sanadi, D.R., Vernon, L.P., Ed., pp 3 - 31, New York, Acad.Press
- Blakesly, R.W., Boezi, J.A., 1977, Anal.Biochem. 82, 580 - 582
- Böger, P., 1969, Z. Pflanzenphysiol., 61, 85 - 97
- Böhme, H., Kunert, K.J., Böger, P., 1978, Biochim. Biophys.Acta, 501, 275 - 285
- Böhme, H., Reimer, S., Trebst, A., 1971, Z.Naturforsch., 26 b, 341 - 352
- Bothe, H., Eishrenner, G., 1978, in: Hydrogenases: Their Catalytical Activity, Structure and Function, Schlegel, H.G., Schneider, K., Ed., pp 353 - 369, Göttingen, Erich Goltze KG

- Bothe, H., Tennigkeit, J., Eisbrenner, G., Yates, M.G.,
1977, *Planta*, 133, 237 - 242,
- Brand, J.J., Curtis, V.A., Togasaki, R.K., San Pietro, A.,
1975, *Plant Physiol.*, 55, 187 - 197
- Conover, T.E., Praire, R.E., Racker, E., 1972, *J.Biol.
Chem.*, 238, 2831
- Curtis, V.A., Brand, J.J., Togasaki, R.K., 1975, *Plant
Physiol.*, 55, 183 - 186
- Davies, D.J., 1964, *Annals of the New York Academy of
Science*, 404 - 427
- Davies, D.R., Plaskitt, A., 1971, *Genet.Res.Camb.*, 17,
33 - 43
- Delieu, T., Walker, D.A., 1972, *New Phytol.*, 71, 201 -
225
- Erbes, D.L., King, D., Gibbs, M., 1979, *Plant
Physiol.*, 63, 1138 - 1142
- Frenkel, A.W., 1952, *Arch.Biochem.Biophys.*, 38, 219 -
236
- Fry, I., Papageorgiou, G., Tel-Or, E., Packer, L.,
1977, *Z.Naturforsch.*, 32 c, 110 - 117
- Gaffron, H., 1940, *Am.J.Bot.*, 27, 273 - 283
- Gaffron, H., Rubin, J., 1942, *J.gen.Physiol.*, 26, 219 -
240
- Galante, Y.M., Hatefi, Y., 1979, *Arch.Biochem.Biophys.*
192, 559 - 568
- Galante, Y.M., Hatefi, Y., 1978, in: *Methods of Enzymo-
logy Vol. LIII*, Fleischer, S., Packer, L., Ed.,
pp 15 - 21, New York, Acad.Press.
- Gest, H., Kamen, M.D., 1949, *J.Bacteriol.*, 58, 239 - 244
- Gimmler, H., 1977, in: *Encyclopedia of Plant Physiology*,
Vol. 5, Trebst, A., Avron, M., Ed., pp 448 -
472, Berlin, Springer
- Gorman, D.S., Levine, R.P., 1965, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,
54, 1665 - 1669

- Graham, D., Smillie, R., 1971, in: Methods of Enzymology, Vol. 23, San Pietro, A., Ed., pp 236 - 237, New York, Acad.Press
- Hall, D.O., 1972, Nature New Biology, 235, 125 - 126
- Hall, D.O., 1976, in: The Intact Chloroplast, Barber, J., Ed., pp 135 - 170, Amsterdam, Elsevier
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 1979, in: Photosynthesis in Relation to Model Systems, Barber, J., Ed., pp 330 - 364, Amsterdam, Elsevier
- Harth, E., Oettmeier, W., Trebst, A., 1974, FEBSletters, 43, 231 - 234
- Hatefi, Y., 1978, in: Methods of Enzymology, Vol.LIII, Fleischer, S., Packer, L., Ed., pp 11 - 14, New York, Acad.Press
- Hauska, G., 1972, FEBS letters, 28, 217 - 220
- Hauska, G., 1977, in: Encyclopedia of Plant Physiology, Trebst, A., Avron, M., Ed., 253 - 265, Berlin, Springer
- Hauska, G.A., McCarty, R.E., Berzborn, R.J., Racker, E., 1971, J.Biol.Chem., 246, 3524 - 3531
- Hauska, G.A., McCarty, R.E., Racker, E., 1970, Biochim. Biophys.Acta, 197, 206 - 218
- Hauska, G., Oettmeier, W., Reimer, S., Trebst, A., 1975, Z.Naturforsch., 30 c, 37 - 43
- Hauska, G., Prince, R.C., 1974, FEBS letters, 41, 35 - 39
- Hauska, G., Trebst, A., Draber, W., 1973, Biocim.Biophys. Acta, 305, 632 - 641
- Healey, F.P., 1970 a, Plant Physiol., 45, 153 - 159
- Healey, F.P., 1970 b, Planta, 91, 220 - 226
- Hillmer, P., Gest, H., 1977, J.Bacteriol., 129, 724 - 731
- Hoffmann, D., Thauer, R., Trebst, A., 1977, Z.Naturforsch., 32 c, 257 - 262
- Izawa, S., 1977, in: Encyclopedia of Plant Physiology, Trebst, A., Avron, M., Ed., pp 266 - 282, Berlin, Springer

- Izawa, S., Heath, R.L., Hind, G., 1969, *Biochim. Biophys. Acta*, 180, 388 - 398
- Izawa, S., Pan, R.L., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 83, 1171 - 1177
- Jacobi, G., 1977, in: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Trebst, A., Avron, M., Ed., pp 543 - 562, Berlin, Springer
- Jensen, R.G., Bassham, J.A., 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 1095 - 1101
- Kaltwasser, H., Stuart, J.S., Gaffron, H., 1969, *Planta*, 89, 309 - 322
- Katoh, S., San Pietro, A., 1967, *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 488 - 496
- Kessler, E., 1974, in: *Algal Physiology and Biochemistry*, Stewart, W.D.P., Ed., pp 456 - 473, Oxford, Blachwel
- Kessler, E., 1976, in: *Microbial Production and Utilisation of Gasa*, Schlegel, H.G., Gottschalk, G., Pfennig, N., Ed., pp 247 - 254, Göttingen, Akad. Wiss.
- Kessler, E., 1978, in: *Hydrogenases, Their Catalytic Activity, Structure and Function*, Schlegel, H.G., Schneider, K., Ed., pp 415 - 422, Göttingen, Erich Goltze KG
- Kimimura, M., Katoh, S., 1972, *Biochim. Biophys. Acta*, 283, 279 - 292
- Kimimura, M., Katoh, S., 1973, *Biochim. Biophys. Acta*, 325, 167 - 174
- King, T.E., 1967, in: *Methods of Enzymology*, Vol. X, Estabrook, R.W., Pullman, M.E., Ed., pp 322 - 331, New York, Acad. Press
- King, D., Erbes, D.L., Ben-Amotz, A., Gibbs, M., 1977 a, in: *Biological Solar Energy Conversion*, Mitsui, A., Miyachi, S., San Pietro, A., Tamura, S., Ed., pp 69 - 75, New York, Acad. Press
- King, D., Erbes, D.L., Ben-Amotz, A., Gibbs, M., 1977 b, in: *Research in Photobiology*, Castellani, A., Ed., pp 329 - 334, New York, Plenum

- Klein, U., Betz, A., 1978, *Physiol.Plant.*, 4, 1 - 4
- Knaff, D.B., 1978, in: *The Photosynthetic Bacteria*, Clayton, R.K., Sistrom, W.R., Ed., pp 629 - 640, New York, Plenum Press
- Krasna, A.I., 1977, in: *Biological Solar Energy Conversion*, Mitsui, A., Miyachi, S., San Pietro, A., Tamura, S., Ed., pp 53 - 60, New York, Acad.Press
- Krasna, A.I., 1978, in: *Hydrogenases: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, Schlegel, H.G., Schneider, H., Ed., pp 423 - 437, Göttingen, Erich Goltze KG
- Krasnovsky, A.A., 1979, in: *Photosynthesis in Relation to Model Systems*, Barber, J., Ed., pp 281 - 289, Amsterdam, Elsevier
- Krasnovsky, A.A., Brin, G.P., Nikandrov, V.V., 1975, *Dok.Akad.Nauk.SSSR*, 220, 1214 - 1217
- Lien, S., Bannister, T.T., 1971, *Biochim.Biophys.Acta*, 245, 465 - 481
- Lovenberg, W., Buchanan, B.B., Rabinowitz, J.C., 1963, *Bio.Chem.*, 238, 3899 - 3913
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, *J.Biol.Chem.*, 193, 265 - 275
- McBride, A.C., Lien, S., Togasaki, R.R., San Pietro, A., in: *Biological Solar Energy Conversion*, Mitsui, A., Miyachi, S., San Pietro, A., Tamura, S., Ed., pp 77 - 86, New York, Acad.Press
- McCarty, R.E., 1974, *Arch.Biochem.Biophys.*, 161, 93 - 99
- Nelson, N., Drechsler, Z., Neumann, J., 1970, *J.Biol.C Chem.*, 245, 143 - 151
- Niederman, R.A., Gibson, K.D., 1978, in: *The Photosynthetic Bacteria*, Clayton, R.K., Sistrom, W.R., Ed., pp 79 - 118, New York, Plenum Press
- Oelze, J., Drews, G., 1970, *Biochim.Biophys.Acta*, 219, 131
- Oettmeier, W., Lockau, W., 1973, *Z.Naturforsch.*, 28 c, 717 - 721
- Oettmeier, W., Reimer, S., Trebst, A., 1974, *Plant Science Letters*, 2, 267 - 271

- Packer, L., Cullingford, W., 1978, Z.Naturforsch., 33 c, 113 - 115
- Racker, E., 1976, in: A New Look at Mechanism in Bioenergetics, Racker, E., Ed., pp 93 - 95, New York, Acad.Press
- Ragan, C.I., Racker, E., 1973, J.Biol.Chem., 248, 6876
- Rao, K.K., Hall, D.O., 1979, in: Photosynthesis in Relation to Model Systems, Barber, J., Ed., pp 281 - 329
- Rao, K.K., Gogtov, I.N., Hall, D.O., 1978, Biochemie, 60, 291 - 296
- Rao, K.K., Morris, P., Hall, D.O., 1978, in: Hydrogenases: Their Catalytical Activity, Structure and Function, Schlegel, H.G., Schneider, K., Ed., pp 439 - 452, Göttingen, Erich Golz KG
- Rao, K.K., Rosa, L., Hall, D.O., 1976, Biochem.Biophys. Res.Com., 68, 21 - 28
- Renger, G., 1976, Biochim.Biophys.Acta, 440, 287 - 300
- Sane, P.V., Hauska, G., 1972, Z.Naturforsch., 27 b, 932 - 938
- Singer, T.P., Edmondson, D.E., 1978, in: Methods of Enzymology, Vol.LIII, Fleischer, S., Packer, L., Ed., pp 397 - 418, New York, Acad.Press
- Slater, E.C., 1967, in: Methods of Enzymology, Vol. 10, Estabrook, R.W., Pullman, M.E., Ed., pp 48 - 57, New York, Acad.Press
- Spruit, C.J.P., 1954, Proc.Int.Photobiol.Congress 1st, pp 323 - 327
- Spruit, C.J.P., 1958, Meded Landbouwhoges. Wageningen, 58, 1 - 17
- Spiller, H., Ernst, A., Kerfin, W., Böger, P., 1978, Z.Naturforsch., 33 c, 541 - 547
- Stuart, T.S., 1971, Planta, 96, 81 - 92
- Stuart, T.S., Gaffron, H., 1971, Planta, 100, 228 - 243
- Stuart, T.S., Gaffron, H., 1972 a, Planta, 106, 91 - 100
- Stuart, T.S., Gaffron, H., 1972 b, Planta, 106, 101 - 112

- Stuart, T.S., Kaltwasser, H., 1970, *Planta*, 96, 81 - 92
- Surzycki, J.S., 1969, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 63, 1327
- Tagawa, K., Arnon, D.I., 1962, *Nature*, 195, 537 - 543
- Tagawa, K., Tsujimoto, H.Y., Arnon, D.I., 1963, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 49, 567 - 572
- Tel-Or, E., Luijk, L.W., Packer, L., 1978, *Arch.Biochem. Biophys.*, 185, 185 - 194
- Trebst, A., 1974, *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 25, 423 - 458
- Trebst, A., 1978, in: *Energy Conversion in Biological Membranes*, Schäfer, G., Klingenberg, M., Ed., pp 84 - 95, Berlin, Springer
- Trebst, A., Harth, E., Draber, W., 1970, *Z.Naturforsch.*, 25 b, 1157 - 1159
- Trebst, A., Reimer, S., 1973 a, *Z.Naturforsch.*, 28 c, 710 - 716
- Trebst, A., Reimer, S., 1973 b, *Biochim.Biophys.Acta*, 305, 129 - 139
- Trebst, A., Wietoska, H., Draber, W., Knobs, H.J., 1978, *Z.Naturforsch.*, 33 c, 919 - 927
- van Lin, B., 1977, Dissertation, Bochum
- Warburg, O., Christian, 1941, *Biochem.Z.*, 310, 284
- White, C.C., Chain, R.K., Malkin, R., 1978, *Biochim. Biophys.Acta*, 502, 127 - 137
- Wildner, G.F., Hauska, G., 1974, *Arch.Biochem.Biophys.*, 164, 127 - 135
- Williams, D.E., Reisfeld, R.A., 1964, *Annals New York academy of Science*, 121, 373 - 381
- Yannai, Y.Y., Epel, B.L., Neumann, J., 1976, *Plant Science Letters*, 7, 295 - 304
- Yoch, D.C., 1978, in: *The Photosynthetic Bacteria*, Clayton, R.K., Sistrom, W.R., Ed., pp 657 - 676, New York, Plenum Press
- Zähringer, M., Dissertation, 1973, Freiburg

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Trebst für die Überlassung des Themas, für seine stete Bereitschaft zur Diskussion und für seine wohlwollende Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Auch den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie der Pflanzen danke ich für die Unterstützung, die ich während meiner Arbeit erfahren habe.

Lebenslauf

Am 28. Oktober 1952 wurde ich als Tochter des Karosseriebautechnikers Reinhold Hoffmann und seiner Frau Irmtraud, geb. Marten, in Castrop - Rauxel geboren. Im Jahre 1959 wurde ich in die dortige Gustav - Adolf - Volksschule eingeschult. Ab Frühjahr 1963 besuchte ich das Neusprachliche Ernst - Barlach - Gymnasium in Castrop - Rauxel, wo ich 1971 das Abitur ablegte. Vom Wintersemester 1971 / 72 an studierte ich an der Ruhr - Universität Bochum Biologie und Chemie. Am 19. November 1976 legte ich in diesen beiden Fächern die Erste Philologische Staatsprüfung ab. Meine Hausarbeit mit dem Titel "Photosynthetische Wasserstoffentwicklung in isolierten Chloroplasten" fertigte ich bei Herrn Prof. Dr. A. Trebst an.

Seit dem Winter 1977 arbeitete ich am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Trebst an der vorliegenden Dissertation.

Am 11. September heiratete ich den Studienreferendar Gerhard Godde und nahm den Familienname Godde an.

